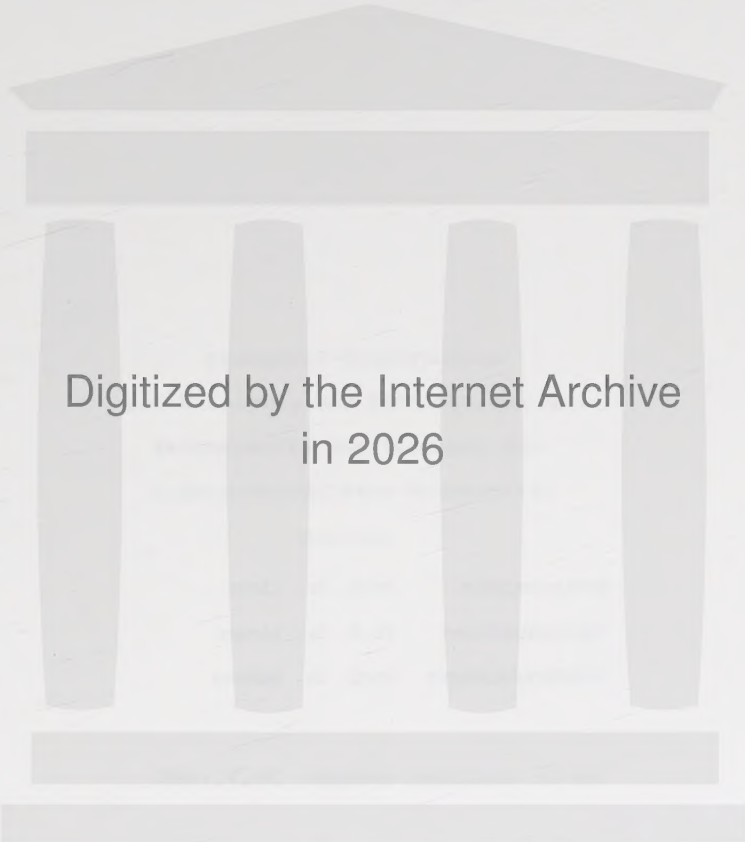


**ZUM PROBLEM DES
PLASMODIUM FALCIPARUM
„KNOB-PROTEINS“: IDENTIFIZIERUNG
UND CHARAKTERISIERUNG EINES
92 000 Da PROTEINS**

vorgelegt von
Jean Paul Vernot Hernandez

*Diss
München
1985*



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554807_0052

Erstgutachter: Prof. Dr. Cleve
Zweitgutachter: Prof. Dr. Linzen
Sondergutachter: Prof. Dr. Hannig

Tag der mündlichen Prüfung: 26.7.1985

ZUM PROBLEM DES PLASMODIUM FALCIPARUM
"KNOB-PROTEINS": IDENTIFIZIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG
EINES 92 000 Da PROTEINS

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktergrades des
Fachbereichs der Biologie der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Jean Paul Vernot Hernandez

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 1982 bis Juni 1985 am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. K. Hannig und Herrn Dr. H.-G. Heidrich möchte ich für die Ermöglichung und Förderung der Arbeit, sowie für das Auslandsstipendium der Max-Planck-Gesellschaft meinen Dank aussprechen.

Herrn Prof. Dr. H. Cleve danke ich herzlich für die Vertretung dieser Arbeit an der Ludwig-Maximilians-Universität.

Besonders danke ich Dr. L.F. Duque, Dr. M. Wasserman und Dr. C. Espinal, Instituto Nacional de Salud, Bogota, für die ständige Unterstützung.

Weiter möchte ich allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für ihre Hilfe danken.

INHALTSVERZEICHNIS

A. EINLEITUNG	4
B. MATERIAL UND METHODEN	12
B. 1 Chemikalien	12
B. 2 Medien und Puffer	13
B. 3 Methoden	14
B. 3.1 Kulturen	14
B. 3.2 Einfrieren und Auftauen von Parasiten	16
B. 3.3 Zell-Zählung	16
B. 3.4 Anreicherung von Parasiten	17
B. 3.5 Synchronisierung von Parasiten	18
B. 3.6 Metabolische Markierung der Parasiten mit radioaktiven Isotopen	19
B. 3.7 Jodierung	20
B. 3.8 Isolierung von Membranen aus infizierten Erythrozyten und von freien Parasiten	21
B. 3.9 Enzymatische Abspaltung und Spaltung von Parasitenantigenen	23
B. 3.10 Invasionstest	24
B. 3.11 Glycoproteinanalyse	24
B. 3.12 Extraktion mit Detergentien	24
B. 3.13 Zytoadhäsionstest	25
B. 3.14 Elektronenmikroskopie	26
B. 3.15 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	27
B. 3.16 Proteinbestimmung	28
C. ERGEBNISSE	29
C. 1 Kulturen	29
C. 2 Identifizierung eines klonspezifischen Proteins	31
C. 3 Synthesezeitpunkt des 92 000 Da Proteins	34
C. 4 Lokalisation des 92 000 Da Proteins in der Zelle	38
C. 5 Zeitdauer des Einbaus des 92 000 Da Proteins in das Erythrozytenmembran-Zytoskeletonkompartiment	43
C. 6 Die Assoziation des 92 000 Da Proteins mit Knobs	44
C. 7 Glycoproteinbestimmung	48
C. 8 Nachweis der Identität des 92 000 Da Proteins des FCBl- und FCR3- Stammes	48
C. 9 Extraktion mit Detergentien	50
C. 10 Zytoadhäsionstest	51
C. 11 Oberflächenmarkierung	55
D. DISKUSSION	57
E. ZUSAMMENFASSUNG	68
F. LITERATURVERZEICHNIS	72

A. EINLEITUNG

Plasmodium falciparum verursacht die höchste Erkrankungs-
ziffer und Sterblichkeitsrate unter allen der vier Mala-
riareagern, welche den Menschen infizieren können. Das
Krankheitsbild (autoimmune Anämie, Splenomegalie, Fieber,
Nierenversagen und Koma) ist bedingt durch die Entwicklung
und Proliferation von asexuellen Stadien innerhalb von
Erythrozyten. Diese Entwicklungsstadien des Parasiten sind
am empfindlichsten gegenüber einer natürlich erworbenen
Immunität, die allerdings nur bei Eingeborenen in endemi-
schen Gebieten zu finden ist. Dabei scheint es, daß sowohl
die humorale (Cohen S., 1979; Deans I.A., 1983) wie auch die
zelluläre (Allison A.C., 1983) Immunantwort eine wesentliche
Rolle bei dieser Immunität spielen.

Bei experimentell erzeugten Malariainfektionen im Tier zeigt
sich jedoch, daß der Schutz vor Malaria artspezifisch sein
kann, d.h., daß eine Infektion mit einem bestimmten Stamm
nicht unbedingt vor einem anderen Stamm schützen muß. Bei
natürlichen Infektionen in endemischen Gebieten ist eine
lange Zeitdauer mit sich wiederholenden Infektionen not-
wendig, bevor das Immunsystem des Wirtes die Parasiten im
Blutkreislauf ausschalten kann. Dazu muß der Wirt
Infektionen durch die meisten im betreffenden endemischen
Gebiet vorhandenen Plasmodien-Stämmen ausgesetzt sein.
Deshalb baut sich auch die Immunität des Menschen nur
langsam im Verlauf von aufeinander folgenden Infektionen
auf, aber vollständiger Schutz (sterile Immunität) wird

wahrscheinlich nie erreicht: Von Zeit zu Zeit wird auch noch eine geringfügige Parasitämie bei immunen Erwachsenen festgestellt, die in diesen Gebieten leben.

Infektionen können unter Umständen sehr lange andauern, im Extremfall sogar bis zu drei Jahren. Dies spiegelt ein schwieriges und feinreguliertes Zusammenspiel wider zwischen der Immunabwehr des Wirtes, der eine Immunantwort erzeugt, die P.falciparum weitgehend neutralisiert, und anderen vom Parasiten bewirkten Mechanismen, welche es diesen erlauben, den Immunangriffen des Wirts zu entgehen. Die Tatsache, daß einerseits Neugeborene von immunen Müttern während der ersten drei Lebensmonate relativ selten an schweren Malariainfektionen erkranken und daß andererseits die passive Immunisierung mit Immunglobulinen von Erwachsenen aus endemischen Gebieten Kinder mit akuter P.falciparum Infektion heilen kann (Mc. Gregor, 1983; Cohen, 1969) legt nahe, daß Antikörper gegen Antigene der erythrozytären Stadien gebildet werden können. Daher sollte es möglich sein, auch nach aktiver Immunisierung mit Malaria-Antigenen einen Schutz gegen den Malaria-Parasiten zu erreichen.

Die asexuellen Stadien von P.falciparum bleiben ungefähr 48 Stunden im Erythrozyten. Dieser Zyklus beginnt mit dem Eindringen eines exoerythrozytären Merozoiten (der sich in der Leber nach der Übertragung durch die Anophelesmücke entwickelt hat) in das rote Blutkörperchen. Indem er vor direktem Kontakt mit dem Immunsystem geschützt ist, kann sich der Parasit entwickeln und vermehren, wobei vier

morphologische Stadien unterschieden werden: Ring, Trophozoit, Schizont und Segmenter (Abb. 1). Somit wird ersichtlich, daß nur der Merozoit und die Membran des infizierten Erythrozyten dem Immunsystem des Wirtes direkt ausgesetzt sind, der Merozoit allerdings nur für ganz kurze Zeit (ungefähr 30 Sekunden) (Dvorak, 1975). Die Möglichkeit, daß antigene Determinanten des Parasiten, die eine Funktion für die Parasiten haben müssen, für einen längeren Zeitraum auf der Oberfläche eines infizierten Erythrozyten exponiert werden (für P.falciparum ca. 24 Stunden), eröffnet somit neue Wege, um den Parasiten auch durch eine aktive Immunisierung bekämpfen zu können.

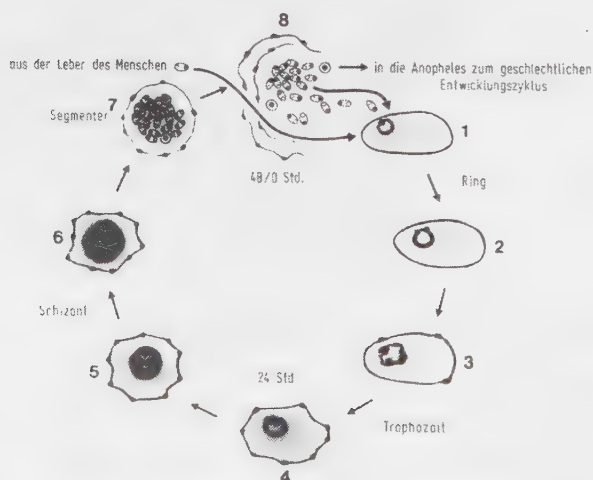


Abb. 1 Erythrozytärer Entwicklungszyklus von Plasmodium falciparum Merozoiten mit der Fähigkeit, neue Erythrozyten zu befallen, werden nach 48 h freigesetzt.

Die Membran von Malaria-infizierten Erythrozyten (MIE) zeigt dramatische Veränderung in ihrer Funktion und Struktur (Aikawa, M., 1977), wenn sich der Parasit vom Ring zum Segmenterstadium entwickelt. Funktionelle Abweichung beinhalten veränderte Permeabilität für Glukose, organische Moleküle (Sherman I.W., 1979) selektive Permeabilität für Anionen (Kutner, 1983), Reorganisation von Lipiden (Holz G.G., 1977), Abbau von Proteinen (Spektrin und Bande 4) Zunahme von Na^+ und Ca^{2+} Gehalt und Permeabilität (Dunn N.I., 1969; Leida M.N.S.R., 1981), sowie Zunahme an osmotischer Fragilität. Die Konzentration von einigen Membran-assoziierten Enzymen wie Acetylcholinesterase und Adenylatcyclase nimmt in P.falciparum und P.chabaudi zu (Areebul S., 1982; Koenigk E., 1977). Es ist auch über Veränderungen im Sialinsäuregehalt sowie Abnahme von Cholesterin berichtet worden. Weiterhin zeigen menschliche rote Blutkörperchen, die mit P.falciparum infiziert worden sind, große morphologische Modifikationen der Membran-Ultrastruktur in Form von Verdickungen ("Knobs"), die auf der zytoplasmatischen Seite der Erythrozyten-Plasmamembran liegen (Trager W., 1966; Luse S.A., 1971). Die Knobs erscheinen zuerst in der Membran von mit Trophozoiten-infizierten Erythrozyten (nach dem Ringstadium) und die Zahl nimmt zu, wenn der Parasit zum Schizonten und Segmenter-Stadium heranreift (Langreth S., 1978). Im Gegensatz dazu haben andere Autoren durch Verwendung von Scanning-Elektronenmikroskopie herausgefunden, daß Erythrozyten infiziert mit Trophozoiten, weniger große Knobs besitzen, als Schizont-in-

fizierte Zellen (Gruenberg, 1983). Im Elektronenmikroskop (EM) erscheinen diese Knobs als elektronendichtes Material mit einem Durchmesser von 70-160 nm. Die Knob-Dichte schwankt zwischen 10-35 Knobs/ μm^2 (Gruenberg, 1983). Die gleichen Autoren haben auch die Synthese und Verteilung von Knobs während der Reifung der Parasiten untersucht. Sie entdeckten, daß die Knob-Größe kleiner wird, wenn die Knob-Dichte zunimmt, und daß die Knobs der früheren Trophozoiten-Stadien in speziellen Domänen gebildet werden. Wenn der Parasit zum Schizont-Stadium heranreift, ist die Verteilung der Knobs verstreut als ob sie sich gegenseitig abstoßen würden.

Es ist gezeigt worden, daß Langzeit in vitro Kultivation von P.falciparum in menschlichen Erythrozyten zum Verlust der Knobs auf der Oberfläche von Trophozoiten und Schizonten-infizierten Erythrozyten führt (Langreth, 1979). Zusammen mit dieser Eigenschaft geht auch die Fähigkeit verloren, die Parasiten in Gelatinesuspension konzentrieren zu können. Diese Prozedur wird allgemein für die Selektionierung von Knob-positiven (K^+) und Knob-negativen (K^-) Stämmen herangezogen. Da die Knobs Antikörper binden, die entweder aus Serum von immunen Affen stammen (Langreth, 1979) oder die mit Hilfe gereinigter Parasiten gebildet worden sind (Kilejian, 1977), ist vermutet worden, daß die Knobs plasmodiale Antigene beinhalten. Zusätzlich wurde vor Kurzem festgestellt, daß niedrige Konzentrationen von humanen und Immunseren von Aotusaffen die Aufnahme von ^{35}S -Methionin in der Kultur hemmen (Stanley, 1984a). Diese Hemmung verlief

parallel zum Erscheinen von Trophozoiten und der Bildung von Knobs auf der Oberfläche der infizierten Erythrozyten. Diese Hemmung wurde bei K^- -Klonen nicht beobachtet. Die gleichen Autoren konnten die Aktivierung des klassischen Komplementsystems durch die MIE-Oberfläche zeigen, und sie schlugen vor, daß die Knobs Moleküle besitzen könnten, welche die Aktivierung des alternativen Komplementsystems verursachen (Stanley, 1984b).

Kilejian (1979) hat zuerst das Vorhandensein von einem 70-80 000 Da Protein in dem K^+ -FCR3-Stamm aus Gambia gezeigt, welches in den homologen K^- Parasiten abwesend war. Bei klonierten Parasiten hat man später die Assoziation eines 90 000 Da Proteins mit den Knobs gefunden (Hadley, 1983). Diese Protein besitzt ähnliche Charakteristika wie das von Kilejian beschriebene. Die gleichen Autoren erhielten aber auch Parasitenpräparationen, in welchen das 90 000 Da Protein ("Knob-Protein") nicht identifiziert werden konnte (Howard, 1983; Hadley, 1983). Wiederum andere Autoren haben nie ein solches Protein gefunden, wenn infizierte Erythrozyten-Membranen durch Bindung an feste Matrix (Gruenberg, 1983) oder durch hypotone Lyse (Allred, D. 1983) isoliert wurden. Ferner ist es bisher nicht eindeutig nachgewiesen, ob dieses Protein tatsächlich in der Erythrozyten-Membran lokalisiert ist.

Mit P.falciparum Trophozoiten und Schizonten-infizierte Erythrozyten werden selten in peripheren Blutkreislauf beobachtet. Sie ziehen sich am Ende des Ringstadiums in die

zentralen Kapillaren z.B. des Gehirns zurück (Sequestration). Dort haften sie sich über die Knobs an die Endothelzellen der Kapillaren an, ein Vorgang, bei dem z.B. das Knob-Protein eine Rolle spielen könnte. Die Anheftung von MIE in den Blutgefäßen ist von großer Bedeutung für das Überleben des Parasiten, da er, geschützt durch den Erythrozyten somit der Erkennung der Milz entgeht, welche für die Vernichtung der MIE verantwortlich ist (Kreier, 1980; Wyler, 1979). Der Zytoadhäsionsvorgang von MIE kann in vitro an Endothelial- oder Melanomazellen untersucht werden (Udeinya, 1981; Schmidt, 1982). Dieser Test mit Melanomazellen wurde verwendet, um zu zeigen, daß ein Immuns serum die Zytoadhäsion hemmen kann. Auch bereits gebundene Zellen konnten mit Immuns serum wieder losgelöst werden (Udeinya, 1983). Des weiteren verursachen Immuns eren von Squirrel-Affen, die mit P.falciparum infiziert wurden, die Freisetzung von sequestrierten Parasiten in den Blutkreislauf (David, 1983). K⁻ Parasiten dagegen binden in vitro an keinerlei Zielzellen. In dem Aotus trivirgatus Modell waren K⁻-Klone immunogen, aber nicht pathogen (Langreth, 1985; Grenn T.S., 1985). Da in Tieren, welchen die Milz entfernt worden war, der klonierte K⁻-Stamm virulent war, kann man annehmen, daß die Milz eine Rolle bei der Beseitigung des reifen Parasiten spielt. Der Mechanismus dieser sehr schnellen Zerstörung von K⁻-MIE in der Milz könnte eventuell darauf zurückzuführen sein, daß der Erythrozyt seine Flexibilität verloren hat (Cranston, 1984).

Betrachtet man all diese Punkte, so scheint es, daß der

Gebrauch von Knob-spezifischen Antiseren oder von aktiv gebildeten Antikörpern gegen Knobs, welche die Knob-Funktionen neutralisieren, eine weitere Möglichkeit sein könnte, die Pathogenität der Malaria in den Griff zu bekommen.

Ziele der vorliegenden Arbeit

Unter Berücksichtigung des Diskutierten und der von anderen gewonnenen Erkenntnisse sind die Ziele der vorliegenden Arbeit:

- (1) Die Entwicklung von Verfahren, mit denen Membranen aus infizierten Erythrozyten frei von Membranen nicht infizierter Erythrozyten und frei von Parasiten oder Parasitenbestandteilen gewonnen werden können.
- (2) Die eindeutige Lokalisierung des "Knob-Proteins" in der Erythrozytenmembran. Diese Membranfraktion soll als Ausgangsmaterial für die weiteren Untersuchungen dienen.
- (3) Die Charakterisierung des/der Proteins/e, die mit den Verdickungen der Membranen infizierter Erythrozyten, den Knobs, in Verbindung gebracht werden können.
- (4) Erkenntnisse zu gewinnen über die Biosynthese dieses/r Proteins/e und der Funktion/en dieses/r Proteins/e für den infizierten Wirts-Erythrozyten oder den Parasiten.

B. MATERIAL UND METHODEN

B. 1. Chemikalien

Alle Reagenzien waren von p.A. Qualität. Sie wurden von MERCK bezogen, mit Ausnahme von:

SIGMA, USA:

Natriumbikarbonat (NaHCO_3)
 Gentamycin
 N-2 Hydroxyäthylpiperazin-N-2 äthansulfonsäure (HEPES)
 Sojabohnen Trypsin Inhibitor
 Hydroxymercurobenzoat (PCMB)
 N- -p Tosyl-L-Lysin Chloromethyl Keton (TLCK)
 Neuraminidase (Clostridium perfringens Type VIII)
 Triäthanolamin (TRA)
 Albumin, Rind, Fraktion V (BSA)
 Saponin
 Octyl Phenoxy Polyäthoxyäthanol (Triton X-100)
 Polyoxyäthylenalkohol (Lubrol)
 Polyoxyläthylensorbitan Manolaurat (Tween 20)
 Lectin (Phaseolus vulgaris Type V)
 Antipain
 Bestatin
 Pepstatin A

SERVA, Heidelberg

Acrylamid
 N,N,N',N'-Tetramethyl-äthylendiamin (TMED)
 Coomassie Brilliant blue R250
 Dodecylsulfat-Na-Salz (SDS)

BOEHRINGER, Mannheim

Chymotrypsin (aus Rinderpankreas)
 Lactoperoxidase
 Glucoseoxidase

CALBIOCHEM-BEHRING, USA

3- (3,Cholamidopropyl)dimethylammoniol-1-Propansulfonat)
 (CHAPS)
 Zwittergent 12 (ZB-12)

New England Nuclear (NEN)

Enlightning
 ^{14}C -Prolin (^{14}C -Pro)
 ^{14}C -Aminosäuren Mischung
 ^{14}C -Glucosamin
 ^3H -Prolin (^3H -Pro)

AMERSHAM, Braunschweig

Natrium ^{125}I Jodid (Na^{125}I)

Natrium ^{51}Cr Chromid (Na^{51}Cr)

BIOCHROM KG, Berlin
Glutamin

PHARMACIA FINE CHEMICALS, Sweden
Percoll

NOVO, Mainz
Trypsin (Trypsin)

BIOCHEMICAL, England
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)

BAYER, Leverkusen
Aprotinin (Trasylol "Bayer")

FLOW LABORATORIES, U.K.
Trypsin-EDTA

J.T. BAKER CHEMICALS, Holland
Glycerin

BIO-RAD, USA
BIS, Acrylamid

RIEDEL-DE HAEN AG, Hannover
Silbernitrat

MILES, USA
Staphylococcus aureus-Protease V8

GIBCO, Scotland
RPMI-1640

C.ROTH, Karlsruhe
2- -Mercaptoäthanol

B. 2 Medien und Puffer

Inkomplettes Medium (IM)
1% (w/v) RPMI 1640, 25 mM HEPES, NaHCO_3 , Gentamycin 33 mg/l,
200 mM Glutamin, pH=7.1

Komplettes Medium (KM)
IM + 10% Menschliches Serum (aus Frischblut)

HBS 200 mM
200 mM HEPES, 1,6 M NaCl

Waschpuffer (WPl)
11 mM TRA, 11 mM Essigsäure, 500 uM $\text{Mg Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$,
50 uM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 5mM Glucose, pH=7,4 und 310mOs.

Waschpuffer (WP2)

WP1 x 2, pH=7,4 und 620mOs.

Kammerpuffer

WP1 + 270 mM Saccharose, pH=7,5 und 320mOs.

Natrium-Jodid-Waschpuffer (NaJ-WP1)

15 mM NaJ in WP1.

Extraktionspuffer 1 (EP1)

20 mM HEPES, 0,16M NaCl, pH=8.0

Extraktionspuffer 2 (EP2)

a. Lösung A 0.13M KH_2PO_4

b. Lösung B 0.13M Na_2HPO_4

zu Lösung B Lösung A geben bis pH=7.4

Einfrierlösung

Einfrierlösung wurde durch Zugabe von 70ml Glycerin (98.7%) zu 180ml Sorbitol-NaCl-Lösung (4,2% und 0,9% "respectively") hergestellt.

Sammelgelpuffer

124 mM TRIS, SDS 0,1% (w/v), Acrylamid 3% (w/v), 5,2 mM bis Acrylamid, 3,4 mM TMED, 2,6 mM Ammoniumperoxodisulfat

Inkubationslösung

0,125 M TRIS/HCl pH 6,8, 0,1% SDS, 1 mM EDTA

Lämlaufschlußpuffer

65 mM TRIS, 5% (v/v), -Mercaptoäthanol, 3% (w/v) SDS und Glycerin 8,7%

Protease Inhibitoren Mischung 1

2% Aprotinin, 2 mM PMSF, 0,2 mM TLCK, 1 mM PCMB

Protease Inhibitoren Mischung 2

2% (v/v) Aprotinin, 2mM PMSF, 5 mg Bestatin, 5 mg Antipain, 5 mg Pepstatin A, alles in 50 ml 70% Methanol.

B. 3. Methoden**B. 3.1 Kulturen**

a) Für die Untersuchungen wurden zwei verschiedene Stämme von Plasmodium falciparum verwendet. Der FCBI Stamm aus Kolumbien, von Dr. C. Espinal (Instituto Nacional de Salud, Bogota) isoliert, und von Dr. K. Rieckmann (University of New Mexico, Albuquerque) erhalten, und zwei Klone (a-2 Knob+

und d-2 Knob-) des FCR3 Gambia Stammes, die freundlicherweise von Dr. W. Trager (Rockefeller University, New York) zur Verfügung gestellt wurden.

Die Stämme wurden nach der "Candle-Jar" Methode von Trager und Jensen (1976) in RPMI- komplettem Medium (KM) in 15 cm quadratischen Schalen bei 37°C und 90% N₂, 5% Co₂ und 5% O₂ kultiviert. Das Medium wurde routinemäßig alle 24 Stunden gewechselt. Nach Erreichen einer Parasitämie von 5-10% wurde je nach Bedarf auf 0.1% Parasitämie verdünnt oder die Kultur ausgebreitet. Die Parasitämie wurde durch Zählung von 10 000 Erythrozyten, nach Methanolfixierung und Giemsaefärbung, bestimmt.

Um Veränderung der Parasiten während einer zu langen Kulturdauer zu vermeiden, wurden verschiedene Portionen infizierter roter Blutkörperchen mit Ringstadien bei -70°C eingefroren und in regelmäßigen Abständen (4-6 Monate) aufgetaut (siehe B. 3.2).

Zur Isolierung von Erythrozyten (E) (Blutgruppe A, Rh+) wurde Frischblut mit ACD-Stabilisator bei 4°C bis zur Verwendung aufbewahrt. Direkt vor der Verwendung der roten Blutkörperchen wurden diese zweimal mit IM und zweimal mit KM gewaschen und anschließend ein Hämatokrit von 3% in KM eingestellt.

b) Melanomazellen wurden freundlicherweise von Dr. M. Hommel (Liverpool School of Tropical Medicine) zur Verfügung gestellt. Es wurde das gleiche Medium wie für die

Malaria-Kultur verwendet und zwar in Kulturflaschen. Nach Erreichen einer Konzentration von $2-3 \times 10^5$ Zellen/ml, wurde mit KM bis zur einer Konzentration von ca. 5×10^4 Zellen/ml verdünnt. Dazu wurden 5 ml einer 0,05% Trypsin-0.02% EDTA Lösung zugesetzt und 5 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Melanoma-Zellen zweimal mit KM gewaschen, gezählt und bei 37°C und 90% N_2 , 5% CO_2 und 5% O_2 in Kultur zurückgesetzt.

B. 3.2 Einfrieren und Auftauen von Parasiten

Waren Ringformen in einer Parasitämie höher als 10% vorhanden, dann wurden die Kulturen geerntet, bei 750 X g zentrifugiert, mit Einfrierlösung 1:1 resuspendiert und in 1 ml Portionen in Einfriertubes übergeführt, sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und darin aufbewahrt. Zum Auftauen wurden die eingefrorenen Zell-Suspensionen bei 37°C inkubiert, zentrifugiert, das entstandene Pellet 1:1 mit 3,5% NaCl (w/v) verdünnt, anschließend zweimal mit KM gewaschen, mit neuen Erythrozyten verdünnt und wieder in Kultur gesetzt.

B. 3.3 Zell-Zählung

Malaria infizierte Erythrozyten (MIE) und Melanoma-Zellen wurden in einer Neubauer-Kammer in einem Phasenkontrast-Mikroskop gezählt. Es wurden immer 80 Felder ausgezählt.

$$\text{Zellzahl/ml} = \frac{\text{Zellzahl} \times 4000 \times \text{Verdünnung} \times 1000}{\text{Zellzahl/ml} = \text{-----}}$$

B. 3.4 Anreicherung von Parasiten

Die Anreicherung des FCR3-K⁺ Klons und des FCB1-Stammes wurde nach der Plasmagel (PG)-Methode (Pasvol, 1978; Reese, 1979; Jensen, 1977) durchgeführt:

Zu einer MIE-Suspension (15% in KM) wurde die gleiche Menge PG zugesetzt und bei 37°C inkubiert. Auf Grund unterschiedlicher Dichten von Erythrozyten und Ringformen und reifen Formen (Trophozoiten, Schizonten) kam es zu einer Trennung, wobei die reifen Formen bis zu einer Parasitämie von 80-95% im Überstand angereichert wurden. Diese Methode ist jedoch nur für Knob⁺ - Stämme möglich.

Anreicherung des FCR3-K⁻-Klons erfolgte in Percoll-Gradienten, die gegenüber der Plasmagel-Methode den Vorteil haben Knob-unabhängig und von größerer Effizienz zu sein (Rivadeneira, 1983). Zwei verschiedene Gradienten wurden durchgeführt. Der erste war ein 60%-iger bereits durch Zentrifugation vorgebildeter und der zweite ein 65%-iger nicht vorgebildeter Gradient. Durch Zugabe von 10 ml HBS 200mM zu 90 ml Percoll wurde eine isoosmotische Lösung erstellt. Für den ersten Gradienten wurden 200 ml dieser 90%-igen Percoll Lösung mit 100 ml NaCl (0,85%) Lösung auf eine 60%-ige Lösung verdünnt. Anschließend wurde 30 min bei 37 000 X g zentrifugiert. Percoll mit einer Dichte kleiner als 1,065 g/ml wurde abgesaugt. Auf 35 ml in dieser Lösung in einem 50 ml Zentrifugentube wurden 2-3 ml einer 50%-igen MIE-Suspension langsam überschichtet und wieder 30 min bei 37 000 X g zentrifugiert.

Der zweite Gradient (Trager, 1984) wurde durch Verdünnung (wie oben beschrieben) der 90%-igen Percoll-Lösung mit KM hergestellt und auch für die Reinigung der Kulturen benutzt. Merozoiten, Pigment und freie Parasiten wurden nach Zentrifugation (20 min, 1600 X g, RT) bei niedrigen Dichten im oberen Teil des Gradienten gefunden und abgesaugt.

Parasiten mit einer Parasitämie von 90% wurden in einer Dichte von 1.098 g/ml gefunden. Percoll wurde durch Waschen mit KM (900 X g, 10 min, RT) entfernt.

B. 3.5 Synchronisierung von Parasiten

Die unter B. 3.4 beschriebenen Methoden können nur zur Gewinnung von Trophozoiten oder reiferen Formen verwendet werden. Bei routinemäßiger Durchführung konnte damit eine relativ gute Synchronie (12-20 Stunden des 48 Stunden Zyklus) erreicht werden. Zur Erreichung einer besseren Synchronie wurde eine kürzere Invasionszeit von 8 h gewählt. Die nach dieser Zeit noch vorhandenen reifen Formen wurden mit Sorbitol lysiert (Lambros, 1979).

Um Ringformen in einer Parasitämie zwischen 30-50% zu erhalten, wurden Kulturen mit höherer Parasitämie (25%) von Schizonten und Segmentern hergestellt. Der Hämatokrit wurde auf 0,5% reduziert und eine 4-6 stündige Merozoiten-Invasion erlaubt. Um wegen der höheren Parasitämie keine Synchronie zu verlieren, wurde alle 6 Stunden Medium gewechselt.

B. 3.6 Metabolische Markierung der Parasiten mit radioaktiven Isotopen

Parasiten der beiden FCR3-Klone im Trophozoiten-Stadium wurden durch Plasmagel (K^+) oder Percoll (K^-) konzentriert (siehe B. 3.5) und dann mit ^{14}C -Prolin (268 Ci/mol) markiert. Radioaktives Prolin wurde bis zu einer Konzentration von ca. 2uCi/ml Medium eingesetzt und die Zellen nach 4-5 stündiger Inkubation mit IM gewaschen. Ebenso wurden Ringformen (K^+ , K^-) mit ^{14}C -Prolin, ^{14}C -Glucosamin (325,5 mCi/mmol), davon 50 uCi/100 ml Kultur, oder einer ^{14}C -Aminosäuremischung markiert. Die Inkubation der Ringe erfolgte über 18 Stunden (Abb. 2A).

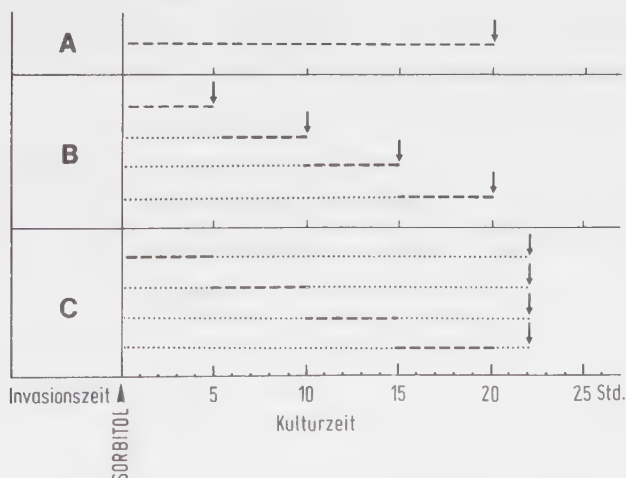


Abb. 2 Verschiedene Strategien für die metabolische Radio-markierung von Plasmodium falciparum Ringstadien: Inkubationszeit mit normalem komplettem Medium (KM); ----- Inkubationszeit mit ^{14}C -Prolin. Die Pfeile zeigen das Ende der Inkubationszeit an und den Zeitpunkt der Extraktion von Gesamtprotein.

Um noch genauere Informationen über den Zeitraum zu erhalten, in dem die Proteine synthetisiert werden, wurden die Parasiten in vier verschiedenen Perioden (je 5 Stunden) markiert. Die Behandlung der Zellen erfolgte nach der Inkubationszeit mit ^{14}C -Prolin (Abb. 2B), oder am Ende der Ringperiode (24 Stunden nach Merozoiteninvasion) (Abb. 2C). Nach Bestimmung des Gesamtzeitraums der Synthese des 92 000 Da Proteins wurden "pulse-chase" Experimente durchgeführt. Dazu wurden 9 Stunden nach Merozoiteninvasion die MIE-Zellen mit der doppelten Menge ^{14}C -Prolin genau 4 Stunden inkubiert, einmal mit KM gewaschen und wieder in Kultur zurückgesetzt. Alle zwei Stunden wurden 3 Platten geerntet ($t=0$ bis $t=8$) und Totalprotein oder Erythrozytenmembran- und Parasitenprotein nach den unter B. 3.8.1 und B. 3.8.2 beschriebene Methoden isoliert.

B. 3.7 Jodierung

Die nach B. 3.5 konzentrierten Klone (K^+ , K^-) wurden mit der Laktoperoxidase-Methode oberflächenmarkiert (Phillips, 1971). Etwa 10^7 Zellen wurden mit Waschpuffer (WP1) dreimal gewaschen (5 min, 100 X g, RT) und in 50 μl WP1 resuspendiert. Zu 50 μl Na^{125}J wurden 200 μl bidest. Wasser ($\text{pH}=10,5$ mit 1NaOH) gegeben und dann mit WP1 doppelter Osmolarität zu gleichen Teilen verdünnt (WP2). Zu den Zellen wurden 20 μl Glukose (50mM in WP1), 50 μl Na^{125}J und 20 μl Enzymlösung (Laktoperoxidase 0,2 mg/l und Glucoseoxidase 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in WP1) zugesetzt. Die MIE wurden 10 min durch leichtes Schütteln in Suspension gehalten und die Reaktion durch Zugabe von 1 ml

eiskaltem NaJ-WPl gestoppt. Anschließend wurde dreimal mit NaJ-WPl gewaschen, mit NP40 (1%, v/v) oder Lämmli-Auflösung-Puffer extrahiert und die Radioaktivität in einem Gammazähler (Beckman) bestimmt (Zählausbeute ca. 80%).

B. 3.8 Isolierung von Membranen aus infizierten Erythrozyten und von freien Parasiten

B. 3.8.1 Membranen

a) Angereicherte Membranfraktionen wurden nach Heidrich (1982) gewonnen:

Zu einer 25% MIE-Suspension wurde die gleiche Menge einer 1%-igen Phytohämagglutinin Lösung gegeben. Die Aggregate wurden in Kammerpuffer (siehe B.2) resuspendiert und danach durch Nylon-Membranen verschiedener Größe (100-60-40-20-10-5-3 und 1 μ m) in Serie filtriert. Die meisten Parasiten und nicht zerstörte Zellen wurden abzentrifugiert (700 X g, 10 min 4°C). Hämoglobin wurde bei der Zentrifugation entfernt (48 000 X g, 30 min, 4°C). Die Trennung dieser Mischung (infizierte und nichtinfizierte Membranen, sowie Parasiten) erfolgte durch trägerfreie Elektrophorese (Hannig, 1974). Die Trennbedingungen waren 135 V/cm $\pm$ 10%, 170 mA, 5°C, 2,85 ml/Fraktion/Stunde.

b) Äußerst reine Membranen aus MIE wurden mit einem Percoll-Gradienten erreicht. Die Mischung aus Membranen und Parasiten wurde in 2 bis 3 ml Kammer-Puffer suspendiert und über eine 28%-ige Percoll-Lösung (in HBS 200 mM und NaCl 0,85%) geschichtet. Der Gradient wurde wie unter B. 3.4

beschrieben hergestellt. Anschließend wurde 30 min bei 37 000 X g zentrifugiert.

Die Membranen wurden in einer Dichte zwischen 1,018 und 1,040 g/ml gesammelt und mit Kammer-Puffer gewaschen. Die Membranen wurden auf ihre Reinheit und Einheitlichkeit mit Hilfe von SDS-PAGE und Elektronenmikroskopie geprüft.

B. 3.8.2 Freie Parasiten

Angereicherte freie Parasiten wurden durch drei verschiedene Methoden erhalten.

a) Parasiten wurden durch Waschen der Suspension, die nach B. 3.8.1.a zur Elektrophorese vorbereitet wurden, mit Kammer-Puffer (3 x 5 min, 8000 rpm, RT in einer Beckman-Mikrofuge) isoliert. Protease-Inhibitoren-Cocktail 1 wurde zum Kammer-Puffer zugesetzt (100 ul/10 ml).

b) In einigen Experimenten wurden MIE mit Saponin lysiert. Dazu wurde Saponin (0,1% in IM + Protease-inhibitoren 2) und MIE Zellen im Verhältnis 10:15 gemischt und 10 min bei 37°C inkubiert. Das Lysat wurde mit IM + Inhibitoren verdünnt und dann 30 min bei 48 000 X g zentrifugiert.

c) Freie Parasiten konnten auch aus dem Gradienten

B. 3.8.1 b isoliert werden. Sie wurden bei einer Percoll-dichte zwischen 1,055 und 1,062 g/ml gefunden.

B. 3.9 Enzymatische Abspaltung und Spaltung von Parasitenantigenen

a) Für enzymatische Spaltungen wurden der FCR3-K⁺ Klon und der FCBI Stamm nach B. 3.5 konzentriert, in IM gewaschen, aliquotiert und mit Trypsin (1 mg/ml und 2 µg/ml), Chymotrypsin (1 mg/ml) und Neuraminidase (5 U/ml) 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde mit IM gewaschen, mit IM + Protease Inhibitoren (bei Trypsin mit Sojabohnen Trypsin Inhibitor 3 mg/ml, bei Chymotrypsin mit 2 mM PMSF und bei Neuraminidase mit einer Mischung Aprotinin, PMSF und EDTA) 10 min bei RT inkubiert, wieder mit IM gewaschen und für eine Totalprotein-Extraktion mit SDS verwendet (B. 3.15).

In anderen Experimenten wurden MIE 6 Stunden nach der Sorbitolbehandlung mit Trypsin (1 mg/ml) versetzt, wie oben beschrieben gewaschen, und mit ¹⁴C-Prolin (2 uCi/ml) 15 Stunden markiert. Auch diese Zellen wurden mit IM gewaschen und für die Totalproteinextraktion SDS verwendet (B. 3.15).

b) Limitierte Spaltung mit V8 Protease von Staphylococcus aureus wurde nach der Methode von Cleveland (1977) durchgeführt. Nach dem Entfärben der Gele wurden einzelne Banden ausgeschnitten, mit Inkubationslösung (siehe B.2) gespült und 5 min in Lämmli-Aufschlußpuffer (Lämmli, 1973) bei 98°C gekocht. Anschließend wurden die ausgeschnittenen Gelstreifen in die Taschen eines zweiten Gels manipuliert. Die Gelstreifen in den Kammern wurden mit Sammelgelpuffer + 50 µl Glycerin, Sammelgelpuffer + 30% Glycerin und V8

Protease (1 ug/Tasche) überschichtet. Die elektrophoretische Trennung erfolgte wie üblich. Die Gele wurden fixiert, für die Fluorographie vorbereitet und getrocknet.

B. 3.10 Invasionstest

Nach der Enzymbehandlung, der Behandlung mit den entsprechenden Blockern und Waschen, wurden die Zellen in KM resuspendiert, mit frischen Erythrozyten auf eine Parasitämie von ungefähr 1% verdünnt und weiter kultiviert. Die Entwicklung der Parasiten, die Invasion und die Ringbildung wurde in Giemsa gefärbten Ausstrichen verfolgt.

B. 3.11 Glykoproteinanalyse

Die auf SDS-PAGE analysierten Proteine (siehe B. 3.15) wurden nach der Methode von Gershoni (1983) auf Nitrozellulosemembranen überführt ("blotting"). Die Nitrozellulosefolien wurden angefärbt, um Glykoprotein nachzuweisen (Parish, 1977). Nach dem Trocknen der Nitrozellulosefolien wurden diese für die Fluorographie vorbereitet und dann auf Kodak Film exponiert. Die Gele, von denen die Proteine auf die Nitrozellulose überführt worden waren, wurden mit Coomassie Brilliant Blue oder mit Silber gefärbt (siehe B. 3.15), um zu sehen, ob die Proteine quantitativ überführt worden waren.

B. 3.12 Extraktion mit Detergentien

Detergentien mit unterschiedlichen Eigenschaften kamen für

Totalproteinen-Extraktionen (nur beim $\text{FCR}_3 \text{ K}^+$ Klon) zur Anwendung. Lubrol 1% (g/v), Tween 20 1% (v/v), CHAPS 10 mM, ZB 12 40 mM wurden in EP2 (siehe B.2) und Na-Deoxycholat 1% und 2% (g/v) und Triton X-100 1% (v/v) in EP1 (siehe B.2) gelöst. Triton X-100 1% wurde auch in dest. Wasser mit 5 M Harnstoff präpariert.

B. 3.13 Zytoadhäsionstest

Zum Zytoadhäsionstest wurden die Melanoma-Zellen bis zu einer Konzentration von 2×10^5 Zellen/ml verdünnt. 500 μl dieser Suspension wurden auf ein Deckgläschen (2,2 x 2,2 cm) gesetzt und 24 Stunden bei 37°C in eine Petrischale (3 cm Durchm.) inkubiert. Von jedem Ansatz wurden Doppelproben gemacht. Nach dieser Zeit hatten sich die Zellen am Deckgläschen festgesetzt und 1 ml KM wurde zugegeben. Das Medium wurde sofort abgesaugt und erneut 0.9 ml KM zugesetzt.

Die MIE-Zellen in einer 25%-igen Suspension (4-8% Parasitämie) wurden mit Na^{51}Cr (1 mCi/ml) markiert, eine Stunde in begasten Röhrchen bei 37°C inkubiert, dann dreimal mit KM gewaschen und schließlich zu den Melanoma-Zellen gegeben (100 μl). Die Zellen wurden über eine Stunde geschüttelt. Nicht gebundene Zellen wurden entfernt und die Deckgläschen ausgiebig mit IM gewaschen. Die Waschprozedur wurde in einem umgekehrten Lichtmikroskop verfolgt. Zellen wurden in 2 ml NP 40 (1% in dest. Wasser) aufgelöst und in einem Gammazähler gezählt. In der Mehrzahl der Experimente

wurden MIE oder E nicht mit Na^{51}Cr markiert, sondern mit Methanol fixiert, Giemsa-gefärbt und die Adhäsion im Mikroskop gezählt.

B. 3.14 Elektronenmikroskopie

a) Ultradünnschnitte

Zur Beurteilung der Knob-Strukturen, der Reinheit der isolierten Membranen und Parasiten und der Morphologie der Parasiten in der Kultur wurden die Proben routinemäßig für die Elektronenmikroskopie (EM) eingebettet. Um feststellen zu können, wann die ersten Knobs in den Erythrozyten-Membranen erscheinen, wurden von einer sehr synchronen Kultur (4 Stunden aus den 48 Stunden Zyklus) alle 3 Stunden Proben für das EM hergestellt und zwar über 28 Stunden. Alle Proben wurden mit 2,5% Glutaraldehyd und 2% Osmiumtetroxid fixiert, mit Äthanol entwässert und in Epon 812 eingebettet. Ultradünne Schnitte wurden mit Bleizitrat und Uranylacetat doppelgefärbt, und in einem JEOL 100B Elektronenmikroskop bei 60 kV betrachtet.

b) Autoradiographie im Elektronenmikroskop

Ultradünnschnitte wurden auf Collodium beschichtete Silbernetze aufgefischt. Nach dem Trocknen wurden die mit Schnitten versehenen Netze auf selbstgefertigte PVC Präparatehalter mit Gummilösung leicht angeklebt.

7g Ilford Nuclear Research Emulsion L4 wurden mit 0,8 Teilen dest. Wasser versetzt. Die Emulsion wurde 60 Minuten bei 50°C, dann weitere 12 Stunden bei 40°C im Wasserbad

belassen, und anschließend die Emulsion als Einkornschicht nach der Schlingenmethode (Fischer, 1972) aufgetragen.

Die emulsionsbedeckten Präparate wurden zur autoradiographischen Exposition in mikroskopische Präparierkästen eingelegt und bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Die Entwicklung erfolgte zur gegebenen Zeit mit dem Kodak D76 Entwickler 4 min bei schwachem Gelbfilterlicht (Ilford Safelight 902 S). Nach kurzer Zwischenwässerung wurde mit dem üblichen Fixierer 8 Minuten behandelt, gewaschen und getrocknet.

Nach Doppelkontrastierung mit Blei und Uranylacetat wurden die Präparate im Elektronenmikroskop betrachtet.

B. 3.15 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Die mit SDS und β -Mercaptoäthanol bei 70°C für 30 min denaturierten Proteine wurden im Plattengelfverfahren bei pH 8.8 mit einem 3%-igen Sammelgel von pH 6.8 elektrophoretisch aufgetrennt. Es wurden logarithmische Acrylamidgradienten von 5-15% oder 5-20% verwendet, wobei die Laufzeit ca. 16 Stunden bei 100V und 4°C betrug.

Die Gele wurden mit TCA (20% w/v) oder Methanol (50% v/v) fixiert. Die Anfärbung der Proteinbanden erfolgte mit Coomassie Brilliant Blau R.250 (Fairbanks, 1971) oder Silber (Wray, 1981). Gele mit ^{14}C -Proteinen wurden für die Fluorographie mit Enlightning (NEN) oder PPO/DMSO (Laskey, 1977) vorbereitet und getrocknet, und auf Kodak XOMat Film

exponiert. Gele mit ^{125}J wurden getrocknet und direkt autoradiographiert.

B. 3.16 Proteinbestimmung

Die quantitative Proteinbestimmung wurde nach Heil (1970) auf Zelluloseazetatstreifen mit BSA in unterschiedlichen Konzentrationen als Vergleichsstandard durchgeführt. Die Färbung erfolgte mit 0,25% Amidoschwarz in Essigsäure, Methanol und Wasser (10:45:45), die Entfärbung in der gleichen Lösung ohne Farbstoff.

C. ERGEBNISSE

C. 1 Kulturen

Die Synchronie der Kulturen konnte durch Kombination von Plasmagel (oder Percoll) und Sorbitolbehandlung im Vergleich zu Kulturen, die nur durch eine dieser Prozeduren synchronisiert wurden, erheblich verbessert werden. Nach Lyse der reifen Formen mit Sorbitol wurden zerstörte Zellen, Pigment und Parasiten leicht durch niedrige Zentrifugation (350 X g) und Entfernen der braunen Schicht über den Erythrozyten abgenommen. Dies gelang jedoch nicht, wenn zur Invasion die Kulturen auf hohe Parasitämie (z.B. 25 % und höher) gesetzt wurden. Hier war es unmöglich, das zerstörte Material ohne große Verluste von ring-infizierten Zellen zu entfernen. Um passive Adsorption löslicher Bestandteile an diesen zerstörten Organellen zu verhindern, wurden die Kulturen in einem 65%igen Percollgradienten getrennt. Debris wurde in niedrigen Dichten (siehe Material und Methoden) gefunden und durch Aspiration entfernt. Obgleich die Menge der Merozoiten zur Erreichung einer sehr hohen Parasitämie ausreichend schien (Abb. 3a), konnten nur Werte zwischen 30 und 50% erreicht werden (Abb. 3b).

Die Kulturen wurden routinemäßig auf das Vorhandensein von Knobs überprüft. Dafür wurden konzentrierte Parasiten (K^+ oder K^-) fixiert und im Elektronenmikroskop betrachtet. K^+ Parasiten besaßen immer Knobs auf der Oberfläche der infizierten Erythrozyten (MIE), K^- Formen waren stets frei von Knobs (Abb. 4).

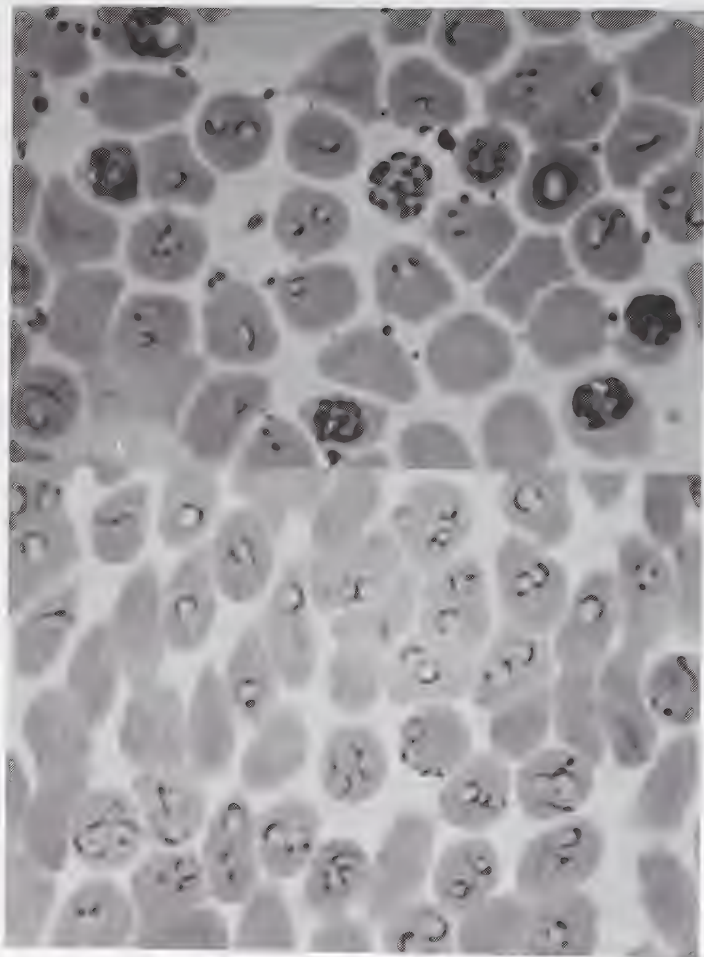


Abb. 3 Synchronisation von *Plasmodium falciparum* in Kultur.
 a) Invasion bei hoher Parasitätie (25%), um genügend Merozoitenmaterial zu erhalten. Die Invasionszeit lag normalerweise zwischen 4 und 8 h b) Die entgültige Parasitätie nach Lyse aller reifen Formen mit Sorbitol betrug nur Werte zwischen 30% und 50%.

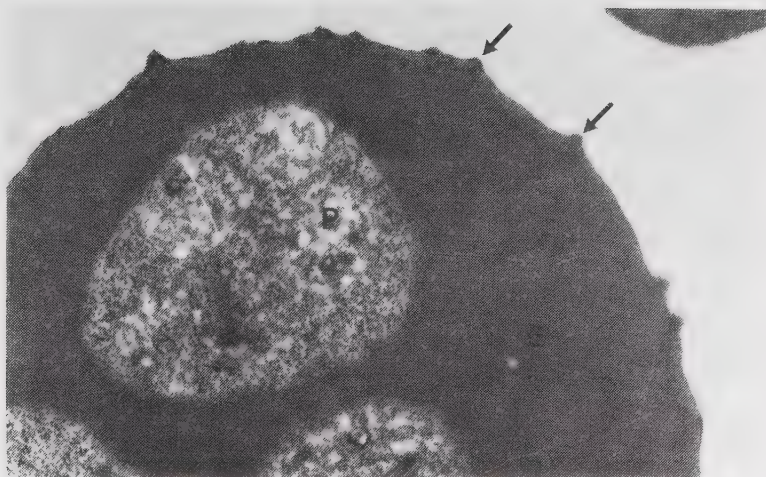


Abb. 4 Elektronenmikroskopische Aufnahme eines infizierten Erythrozyten (E). Der Parasit (P) verursacht die elektronendichten Ausstülpungen (Knobs) auf der Oberfläche des Erythrozyten (Pfeile). Wegen der Anwesenheit von Knobs wird dieser Stamm des Parasiten als ein K^+ -Stamm bezeichnet.

C. 2 Identifizierung eines klonspezifischen Proteins

Erythrozytenmembranen, nach Lektinbehandlung durch trägerfreie Elektrophorese (FFE) isoliert (siehe B. 3.8.1.a) enthielten immer freie Parasiten. Dies ist teilweise darauf zurückzuführen, daß einige Parasiten zum einen nicht aus der Wirtszelle freigesetzt wurden, zum anderen Membranen dazu neigten, Parasiten zu umhüllen oder einzuschließen. Trotzdem konnten Membranen von K^+ infizierten Zellen elektrophoretisch in zwei Populationen getrennt werden, in solche mit Knobs (Fraktionen 28-32, Abb. 5A) und in solche ohne

Knobs (Fraktionen 33-39, Abb. 5B), was auf die unterschiedlichen Oberflächenladungen infizierter und nichtinfizierter Erythrozyten zurückzuführen ist.



Abb. 5 Elektronenmikroskopische Aufnahme von Erythrozytenmembranen die aus K^+ Kulturen durch trägerfreie kontinuierliche Elektrophorese isoliert wurden. A. Fraktionen 28-32 stammen aus infizierten Erythrozyten und besitzen deshalb Knobs (siehe Pfeile). Markierungsstrich: 1 μ m. B. Fraktionen 33-39 enthalten hauptsächlich Membranen nichtinfizierter Erythrozyten. Nur einige wenige Membranen mit Knobs sind zu sehen. Markierungsstrich: 1 μ m.

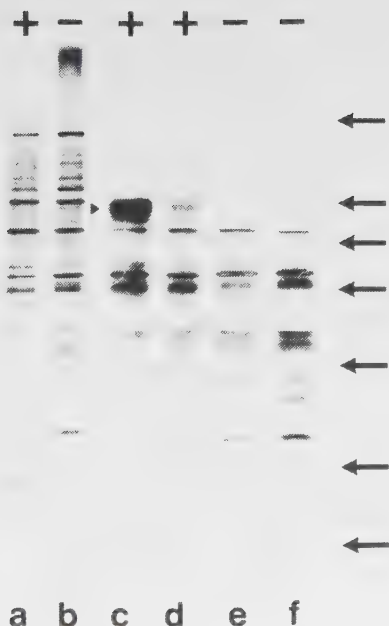


Abb. 6 Fluorogramme nach SDS-PAGE angereicherter Membranpräparationen aus der trägerfreien Elektrophorese (FFE). Die Spur a ist aus Fraktionen 28-32 des K^+ Stammes, die Spur b aus den gleichen Fraktionen des K^- Stammes, die während der Trophozoitenphase mit ^{14}C -Prolin inkubiert wurden. Spuren c bis f wurden während des Ringstadiums markiert (siehe Abb. 2, Methode A). Die Spuren c bis e sind von Fraktionen 28-32 des K^+ bzw. K^- Stammes. Die Spuren d und f sind aus den Fraktionen 33-39 beider Stämme. Die Pfeilspitze zeigt auf das 92 000 Da Protein. Die Pfeile bedeuten Molekulargewichtsmarker, von oben nach unten: Myosin (200 000 Da), Phosphorylase b (94 000 Da), Albumin (68 000 Da), Ovalbumin (43 000 Da), Carbonanhydrase (30 000 Da), Laktoglobulin (18 000 Da) und Cytochrom-c (12 300 Da).

Nach 4-5 stündiger Inkubation von Kulturen im Trophozoitenstadium (etwa 28 h nach Merozoiteninvasion) mit ^{14}C -Prolin konnten in den angereicherten Erythrozytenmembranen mehrere stadienspezifische Proteine gefunden werden. Diese Proteine jedoch waren praktisch identisch in den K^+ und K^- Klonen (Abb. 6, Spur a und b). Im Gegensatz dazu wurden deutliche Unterschiede von isolierten Proteinen von K^+ und K^- Kulturen gefunden, wenn diese im Ringstadium radioaktiv, metabolisch markiert wurden (Abb. 2A, Material und Methoden). Die beiden aus der FFE mit Erythrozytenmembranen angereicherten Präparationen des K^+ Stammes enthielten ein Protein mit 92 000 Da, welches in den beiden entsprechenden Fraktionen des K^- Klons nicht gefunden wurde. In den Fraktionen 28-32 des K^+ Klons ist dies das am stärksten radioaktiv markierte Molekül (Abb. 6, Spur C).

C. 3 Syntheszeitpunkt des 92 000 Da Proteins

Zur Bestimmung des Syntheszeitpunktes des 92 000 Da Proteins wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten Kulturen radioaktiv markiert und Membranen angereichert. Während 5-stündiger Inkubation mit ^{14}C -Prolin und sofortiger Aufarbeitung (Abb. 2B, Material und Methoden) konnte das 92 000 Da Protein in keiner dieser Proben nachgewiesen werden (Abb. 7).

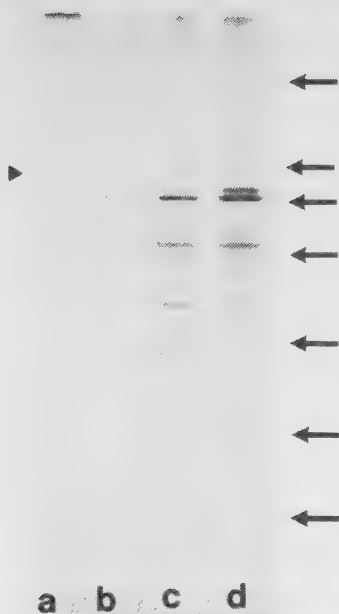


Abb. 7 Fluorogramme nach SDS-PAGE von Ringstadien (K^+), zu unterschiedlichen Zeiten nach Merozoiteninvasion radiomarkiert (siehe Abb. 2, Methode B). 3-8 h (Spur a), 8-13 h (b), 13-18 h (c), 18-23 h (d). Das 92 000 Da Protein ist in keiner der Proben enthalten (Pfeilspitze). Pfeile sind Molekulargewichtsmarker wie in Abb. 6.

Wurden bis etwa 25 h nach Merozoiteninvasion angereicherte Erythrozytenmembranen isoliert (Abb. 2C, Material und Methoden) konnten große Mengen des 92 000 Da Proteins im zweiten und dritten Zeitintervall gefunden werden (Abb. 8, Spur b,c).

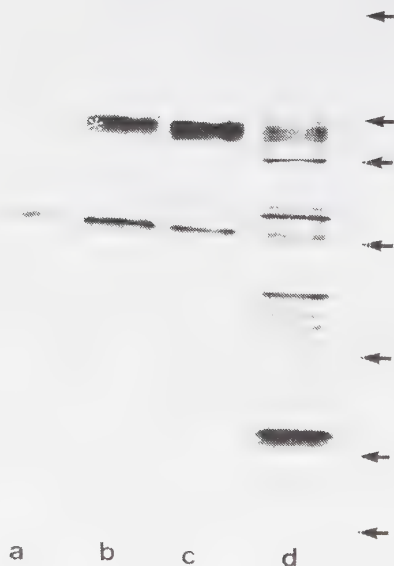


Abb. 8 Fluorogramme nach SDS-PAGE von Ringstadien (K^+), radiomarkiert wie in Abb. 7. Hier aber wurde das Gesamtprotein erst am Ende der Ringperiode extrahiert (siehe Abb. 2, Methode C). Das 92 000 Da Protein ist mit der Pfeilspitze bezeichnet. Pfeile bedeuten Molekulargewichtsmarker wie in Abb. 6.

Keine Spuren dieses Proteins konnten in früher markierten Zellen entdeckt werden (Abb. 8, Spur a), d.h. zwischen 3 und 8 h (+ 3 h) nach Merozoitenbefall, und abnehmende Mengen dieses Proteins im letzten Zeitabschnitt (Abb. 8, Spur d). Diese Experimente weisen darauf hin, daß das 92 000 Da Protein nicht bis 8 h (+ 3 h) nach Merozoitenbefall synthetisiert wurde und daß die Synthese 20 h (+ 3 h) nach der Invasion beendet ist.

Wie aus den Abbildungen 7 und 8 hervorgeht, scheint eine 5-stündige Invasion nicht zur Markierung des 92 000 Da Proteins auszureichen. Um dies herauszufinden und um mögliche Precursor dieses Proteins zu entdecken, wurden "pulse-chase"-Experimente durchgeführt. Dazu wurden infizierte Zellen 9 h nach Merozoiteninvasion über 4 h lang radioaktiv markiert. Das Gesamtprotein daraus wurde alle 2 h durch Extraktion gewonnen. Das 92 000 Da Protein konnte deutlich nur ca. 8 h nach "pulse"-Beginn gefunden werden (Abb. 9, Spur c). Keine weiteren intensiv markierten Proteine, die auf ein Precursor-Molekül hinweisen, konnten zu dieser Zeit und vorher entdeckt werden.



Abb. 9 Fluorogramme von SDS-PAGE Analysen nach einem "pulse-chase" Experiment mit dem K⁺ Stamm (FCR3). Die Proben wurden nach bestimmten Zeiten zur Extraktion des Gesamtproteins entnommen. Spur a ist die Probe nach dem ¹⁴C-Prolin-pulse (t=0, d.h., 9-13 h nach Merozoiteninvasion). Die anderen Proben wurden jeweils 2 h später entnommen. Die Pfeile bedeuten Molekulargewichtsmarker wie in Abb. 6.

C. 4 Lokalisation des 92 000 Da Proteins in der Zelle

C. 4.1 Reine Membranpräparationen, d.h., ohne parasitäre Bestandteile, wurden durch Percollgradientenzentrifugation nach Lektinbehandlung und Filtration durch Nylonsiebe erhalten. Membranen wurden in Gradienten in einer Dichte von

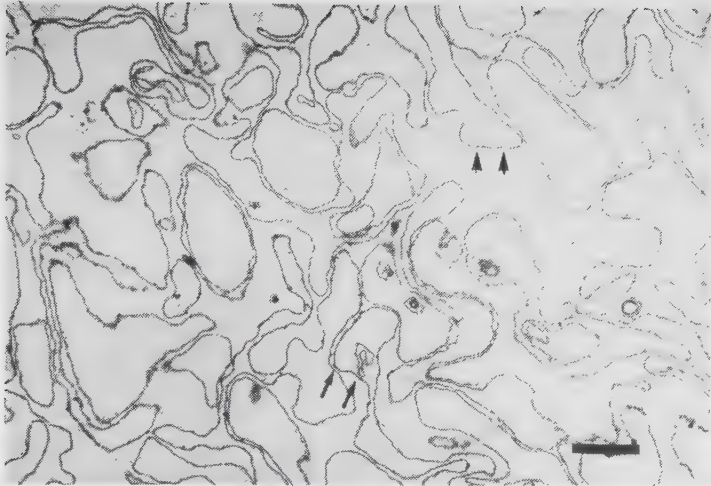


Abb. 10 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Erythrozytenmembranen isoliert aus einer K^+ Kultur durch Percollgradientenzentrifugation. Die Membranen sind eine Mischung von Membranen aus infizierten Erythrozyten mit Knobs (Pfeile) von nichtinfizierten Erythrozyten ohne Knobs (Pfeilspitzen). Keine freien Parasiten sind vorhanden. Markierungsstrich: lum.

1,018–1,040 g/ml gewonnen. Obwohl die so isolierten Membranen eine Mischung knobhaltiger und knobloser Membranen waren, enthielten sie keine kontaminierenden Parasiten (Abb. 10).

Zusätzlich wurden Parasiten frei von Erythrozytenbestandteilen bei einer Dichte von 1,055–1,062 g/ml gefunden. Die Analyse dieser isolierten Membranen und Parasiten durch PAGE zeigte für beide Fraktionen ein charakteristisches Proteinspektrum. Parasiten waren frei von erythrozytären Bestandteilen (Spektrin, Bande 3, Ankyrin) und frei von den für die

Isolation verwendeten Lektin, welches ausschließlich an die Glykoproteine der Erythrozytenmembranen bindet (Abb. 11). Auf der anderen Seite wiesen MIE-Membranen keine Parasitenverunreinigungen auf, wie z.B. niedermolekulare Proteine unterhalb der Bande 7.

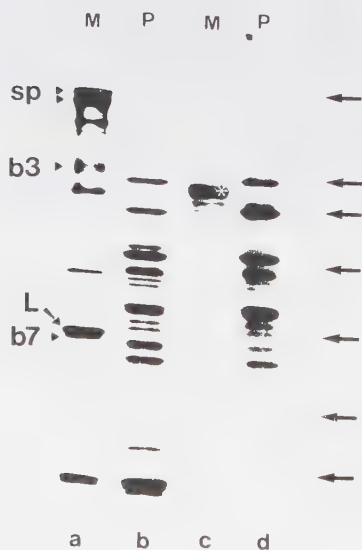


Abb. 11 SDS-PAGE von gereinigten Erythrozytenmembranen (M) und freier Parasiten (P) infiziert mit dem FCBl Stamm. Spuren a und b sind mit Coomassie Blau gefärbt. Spuren c und d sind Fluorogramme von mit ^{14}C -Prolin radiomarkierten Kulturen. Das 92 000 Da Protein, mit einer Pfeilspitze markiert, ist nur in den Erythrozytenmembranen sichtbar. Sp = Spektrin, B7 = Bande 7, L = Lektin. Molekulargewichtsmarker (Pfeile) wie in Abb. 6.

In den Fluorogrammen (Abb. 11, Spur c und d) ist das 92 000 Da-Protein tatsächlich nur in der isolierten Erythrozytenmembran zu finden. Sowohl in den Membranen, als auch in den Parasitenfraktionen konnten zusätzlich jedoch gleiche Proteine entdeckt werden. Diese Proteine haben Molekulargewichte von etwa 80 000, 60 000 und 56 000 Da. Ein Dublett bei 43 000 Da scheint dagegen nur in den Membranfraktionen aufzutreten. Dasselbe Proteinmuster wie im FCR3 K^+ Klon wurde im FCBI Stamm gefunden.

C. 4.2 Hinweise, daß parasiteneigene Proteine in die Membranen (oder das Zytoskelekon) der Erythrozyten eingebaut werden, konnten auch von elektronenmikroskopischen Autoradiographieexperimenten nach metabolischer Markierung mit 3H -Prolin erhalten werden. K^+ Zellen des FCR3 Klons wurden während der ersten 24 h des Zyklus radioaktiv markiert, mit Plasmagel konzentriert, und für die Autoradiographie im Elektronmikroskop vorbereitet. In definierten Abständen wurden die Proben entwickelt und die Silberkörner in den Parasiten, der Erythrozytenmatrix, der roten Blutzellmembran und im "back-ground" gezählt (Abb. 12). Es wurden immer für jedes Experiment 100-150 Zellen ausgezählt. Nach ungefähr 2 Monaten war der "back-ground" schwächer und die Silberkerne über den Zellpartikeln stärker ausgebildet (ungefähr 93% aller Silberkörner waren über den Zellen zu finden) (Tabelle I).

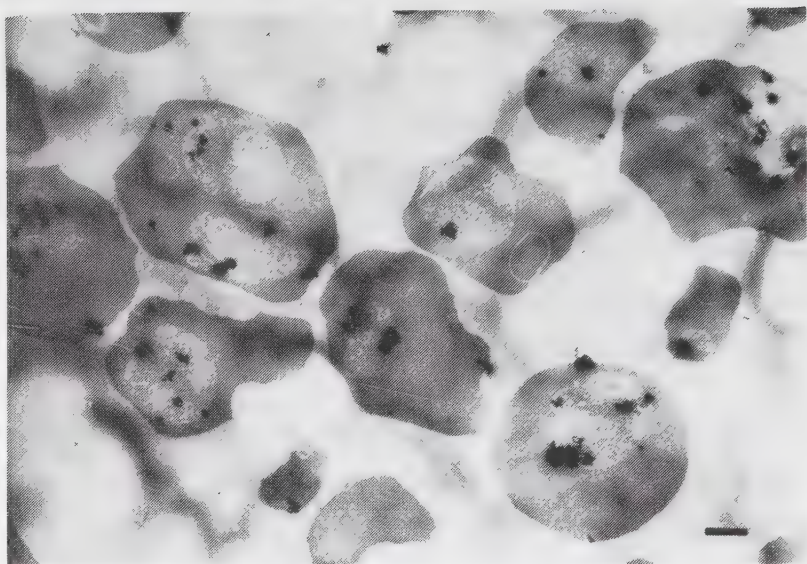


Abb. 12 Autoradiogramm im Elektronenmikroskop von mit *Plasmodium falciparum* (K^+ Stamm) infizierten Erythrozyten, nach Radiomarkierung mit 3H -Prolin in Kultur. Die Silberkörner können hauptsächlich innerhalb der Zellen gesehen werden (Entwicklungszeit ca. 2 Monate). Markierungsstrich: 1 μ m.

Tabelle I

Lokalisierung in der Zelle	Anzahl der Silberkörner	%
Parasit	253	61
Erythrozyten- matrix	76	18
Erythrozyten- membran	56	14
"Back-Ground"	28	7
Summe	413	100

Ungefähr 14% der Radioaktivität ist in der Membran vorhanden. Dieser Wert ist ausgesprochen hoch, wenn man die Oberfläche dieser drei Fraktionen vergleicht. Das stimmt auch mit der Tatsache überein, daß das 92 000 Da Protein das hauptsächliche Protein ist, das in den Membranen dieses Stadiums radioaktiv markiert ist. Eine typische Zelle mit Silberkörnern ist in Abb. 12 gezeigt.

C. 5 Zeitdauer des Einbaus des 92 000 Da Protein in das Erythrozytenmembran-Zytoskeletonkompartiment

"Pulse-chase"-Experimente wurden wie unter C. 3 beschrieben durchgeführt, jedoch wurden hier Membranen und Parasiten durch Percollzentrifugation gereinigt. Membranen wurden 6,8 und 10 h nach "pulse"-Beginn isoliert. Aus Abb. 13 geht eindeutig hervor, daß das 92 000 Da Protein 17 h nach Merozoiteninvasion in großen Mengen in den Membranen auftritt. Parasiten enthielten dieses Protein nie. Das Dublett bei 43 000 Da trat in der Erythrozytenmembran immer gleichzeitig mit den 92 000 Da Protein auf. Dieses Dublett wurde aber auch in dem K⁻ Klon gefunden.

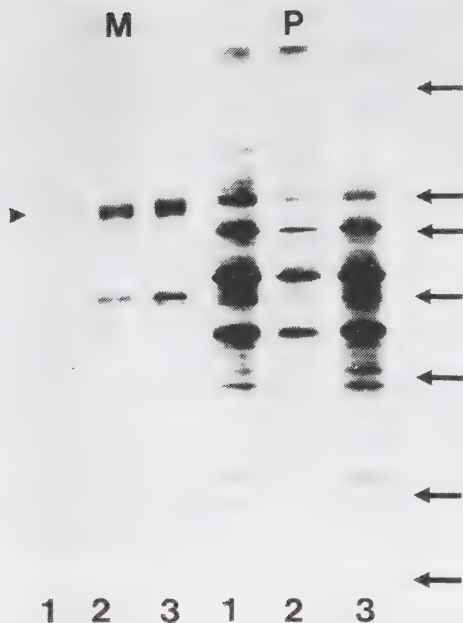


Abb. eines "pulse-chase" Experimentes. Membranen (M) und Parasiten (P) wurden durch Percollzentrifugation 6 h (Spur 1), 8 h (Spur 2) und 10 h (Spur 3) nach Beginn des "pulses" isoliert. Die Pfeilspitze zeigt auf 92 000 Da Protein. Die Pfeile bedeuten Molekulargewichtsmarker wie in Abb. 6.

C. 6 Die Assoziation des 92 000 Da Proteins mit Knobs

C. 6.1 Enzymatische Behandlung infizierter Erythrozyten nach der Bildung des 92 000 Da Proteins.

Trophozoitenstadien, etwa 25 h nach Merozoiteninvasion, d.h., zu einer Zeit, in der das 92 000 Da Protein in der Erythrozytenmembran vorhanden war, wurden mit Enzymen inkubiert, anschließend mit Inhibitoren blockiert, die

Zellen gründlich gewaschen und die Proteine extrahiert. Die Fluorogramme dieser Extrakte nach PAGE zeigen, daß nur das 92 000 Da Protein sensibel für Trypsin, Chymotrypsin und Neuraminidase ist (Abb. 14, Spuren b,c,d). Bei Inkubation mit Trypsin in niedrigen Konzentrationen (2 ug/ml), wurde dieses Protein deutlich abgebaut, konnte jedoch immer noch als schwache Bande nachgewiesen werden (Abb. 14, Spur a).

Ebenso wurden Erythrozytenbestandteile durch diese Enzymbehandlung angegriffen, was in gefärbten Gelen gezeigt werden konnte. Insbesondere wurde Spektrin in quantitativ geringerer Menge gefunden als in allen Kontrollexperimenten. Andere Erythrozytenkomponenten waren in deutlich geringerem Maße davon betroffen (z.B. Bande 2.1 und Bande 3). Diese charakteristische Empfindlichkeit einiger Erythrozytenbestandteile gegen enzymatische Behandlung war jedoch nicht ausschließlich auf infizierte Zellen beschränkt. Nicht infizierte Zellen unterlagen in etwa gleichem Maße diesem proteolytischen Abbau.

Wurden die infizierten Zellen, nach Trypsinbehandlung und Inaktivierung der Enzyme mit Inhibitoren vorsichtig gewaschen, um evtl. noch vorhandenes Enzym zu entfernen, so war die Entwicklung und Reifung der Parasiten vollkommen gewährleistet. Auf diese Art gewonnene Merozoiten waren invasiv und zeigten normale Entwicklung zu Ringstadien in neuen Erythrozyten. Die Zunahme der Parasitämie war ähnlich der in unbehandelten Kulturen.

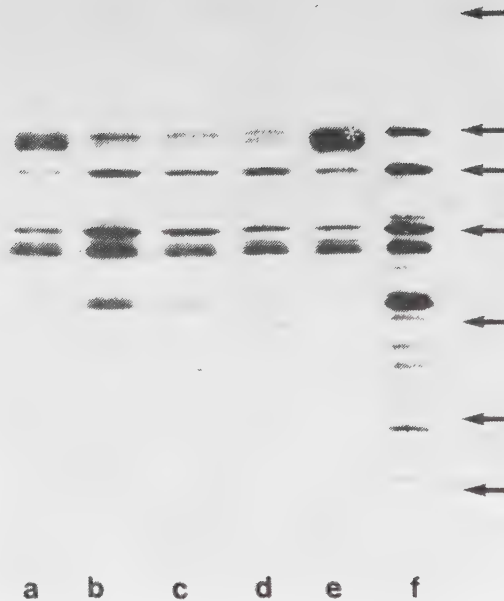


Abb. 14 Fluorogramme nach SDS-PAGE parasitierter Erythrozyten nach Radiomarkierung der Kulturen mit ^{14}C -Prolin und Behandlung mit verschiedenen Enzymen (Spuren a-d nach der Synthese, Spur f vor der Synthese des 92 000 Da Proteins). Alle Gesamtproteinextrakte wurden ca. 25 h nach Merozoiteninvasion hergestellt. Die Enzyme waren: Spur a Trypsin 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Spur b Trypsin 1 mg/ml ; Spur c Chymotrypsin 1 mg/ml ; Spur d Neuraminidase 5 U/ml ; Spur f Trypsin 1 mg/ml . Die Spur e ist die Kontrolle, die nur mit inkompletten Medium inkubiert wurde. Das 92 000 Da Protein ist mit einem Stern markiert. Diese Bande wurde für den limitierten proteolytischen Abbau mit V8 Protease (siehe Abb. 15 Spur c) verwendet.

Das Verhalten der Kulturen nach Neuraminidasebehandlung war dagegen völlig anders. Trotz fehlender Lyse der Zellen gingen unmittelbar nach enzymatischer Inkubation 75-80% der Parasiten nach Waschen mit IM oder IM mit Blockern, verloren und nach weiteren 1-2 h waren beinahe alle Erythrozyten parasitenfrei. Etwa 20 h später konnten keine Segmenter oder Ringstadien mehr gefunden werden, d.h., die Neuraminidasebehandlung hatte die Erythrozytenmembranen so angegriffen, daß die Zellen zerfielen.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen infizierter Erythrozyten nach Enzymbehandlung zeigten in allen Experimenten, daß alle Zellen Knobs besaßen, die von Kontrollzellen nicht unterscheidbar waren.

C. 6.2 Enzymatische Behandlung infizierter Erythrozyten vor der Bildung des 92 000 Da Proteins

Wurden infizierte Erythrozyten mit Trypsin (1 mg/ml) 8-10 h nach Merozoitenbefall behandelt, d.h. zu einer Zeit in der das 92 000 Da Protein noch nicht gebildet war, die Enzyme inhibiert und gewaschen, und dann die Zellen weitere 15 h mit ^{14}C -Prolin inkubiert, konnte kein 92 000 Da Protein gefunden werden (Abb. 14, Spur f).

Darüber hinaus waren normale Erythrozytenkomponenten in Mitteleidenschaft gezogen, wogegen Wachstum und Morphologie der Parasiten, wie aus Giemsa-gefärbten Blutaussstrichen zu sehen war, keine Veränderungen zeigten. Auf beinahe allen infizierten Zellen waren Knobs zu entdecken, die morpholo-

gisch nicht von den Knobs in den Kontrollzellen zu unterscheiden waren. Jedoch schien die Dichte der Zellen einer Veränderung zu unterliegen, was durch die Menge infizierter Zellen nach Plasmagelbehandlung überprüft wurde, d.h., Trophozoiten wurden auch in der unteren Schicht der Plasmagellösung gefunden, in der normalerweise nur Ringformen und nichtinfizierte Erythrozyten auftraten. Auch aus diesen Experimenten erscheint klar, daß Knobs gebildet werden können, auch wenn das 92 000 Da Protein nicht im Membran-Zytoskeleton Kompartiment der Erythrozyten vorhanden ist.

C. 7 Glykoproteinbestimmung

Da die Behandlung mit Neuraminidase einen deutlichen Einfluß auf infizierte Zellen zeigte, wurde die Möglichkeit in Betracht gezogen, daß es sich beim 92 000 Da Protein um ein Glykoprotein handelt. Die Ergebnisse mit Markierung durch ^{14}C -Glukosamin zeigten jedoch, daß das Protein nicht metabolisch glykolisiert werden konnte. Darüber hinaus konnte nach Protein-Transfer auf Nitrozellulose das übergeführte 92 000 Da Protein nicht auf Glykoprotein gefärbt werden.

C. 8 Nachweis der Identität des 92 000 Da Proteins des FCBl- und FCR3- Stammes

Das 92 000 Da Protein wurde, wie in C. 4.1 gezeigt, in beiden K^+ -Stämmen gefunden. Identisches elektrophoretisches

Verhalten zweier Proteine läßt jedoch nicht den Schluß zu, daß beide Proteine homolog sind. Durch limitierten proteolytischen Abbau mit Staphylococcus aureus Protease V8 der 92 000 Da Proteine des FCBl und FCR3 Stammes nach Ausschneiden aus dem Gel und nach erneuter PAGE, konnte gezeigt werden, daß das Abbaumuster beider Proteine identisch ist. 5 Peptide mit Molekulargewichten von 40 000, 34 000, 31 000, 18 000 und 10 000 Da wurden gefunden, und zwar identisch für den FCBl und FCR3 Stamm (Abb. 15, Spuren a,b).

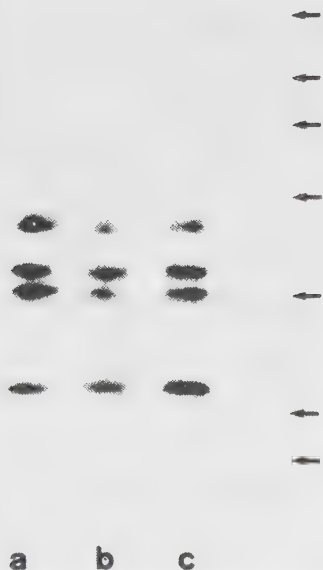


Abb. 15 Fluorogramme eines Staphylococcus aureus V8 Proteaseabbaus des 92 000 Da Proteins nach SDS-PAGE. Die 92 000 Da Proteine von Spur a (FCBl Stamm) und Spur b (FCR3 Stamm) wurden aus gereinigten Erythrozytenmembranen isoliert. Spur c zeigt die Spaltprodukte aus einem 92 000 Da Proteins, das aus einem Gesamtextrakt erhalten wurde (siehe Abb. 14). Pfeile sind Molekulargewichtsmarker wie in Abb. 6.

C. 9 Extraktion mit Detergentien

Eine Extraktion des 92 000 Da Proteins ist nur mit Dergentien möglich, welche das Erythrozytenzytoskeleton ganz zerstören. Keine Unterschiede wurden zwischen anionischen (Natrium Deoxycholat), nichtionischen (Triton X100, Lubrol und Tween 20) und zwitterionischen (CHAPS und CB 12) Detergentien gefunden (Abb. 16, Spuren a-f).

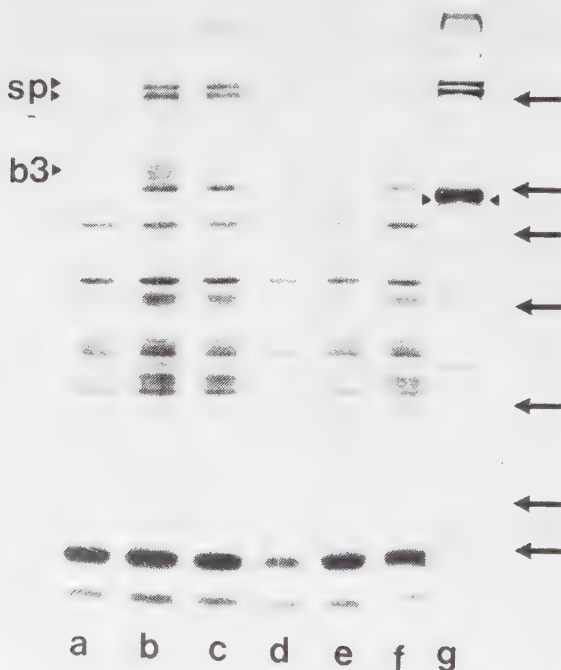


Abb. 16 SDS-PAGE von Plasmodium falciparum-Proben (K^+ , FCR3), nach Extraktion mit verschiedenen Detergentien und Färbung mit Coomassie Blau. Spur a Lubrol; Spur b Natriumdeoxycholat; Spur c Triton X-100 und Natriumdeoxycholat; Spur d Tween 20; Spur e CHAPS; Spur f ZB12; Spur g Triton X-100 und Harnstoff. Sp = Spektrin; B3 = Bande 3. Das 92 000 Da Protein ist mit einer Pfeilspitze bezeichnet. Molekulargewichtsmarker wie in Abb. 6.

Da jedoch durch anionische Detergentien auch Spektrin in großer Menge extrahiert wurde, erschienen diese für die Extraktion des 92 000 Da Proteins ungeeignet. Eine gute Extraktion war nur möglich mit 1% Triton X-100 in 5 M Harnstoff oder mit SDS und β -Mercaptoäthanol. Durch Inkubation der Membran über 1 h mit Triton X-100 (1% v/v) und nachher mit Triton X-100 in 5 M Harnstoff konnte eine Anreicherung des Proteins erreicht werden (Abb. 16, Spur g). Diese Art der Extraktion läßt jedoch keine Immunpräzipitation des 92 000 Da Extraktes zu, da 5 M Harnstoff eine Antigen/Antikörperbindung verhindert.

C. 10 Zytoadhäsionstest

Beide Klone des FCR3 Stammes wurden in vitro auf ihre Fähigkeit, an Melanomazellen zu binden getestet. Bei radioaktiver Markierung der Trophozoiten-Stadien mit ^{51}Cr zeigten sich deutliche Unterschiede in der gebundenen Radioaktivität zwischen beiden Klonen und den nicht-infizierten Erythrozyten. Die Menge gebundenen ^{51}Cr war beim K^+ Stamm immer wesentlich höher als beim K^- Stamm und den Kontrollerythrozyten. Die Waschprozedur nach der Bindung wurde so lange verändert, bis 2 Parallelversuche identische Resultate ergaben und bis im Kontrollwert keine oder nur noch sehr wenige gebundene Erythrozyten im Lichtmikroskop sichtbar waren. Die Ergebnisse von 2 Experimenten mit ihren Parallelversuchen sind in Tabelle II gezeigt.

Tabelle II

	Erythrozyten cpm	FCR3 (K^+) cpm	FCR3 (K^-) cpm
Experiment 1	320 + 16	1440 + 90	564 + 52
Experiment 2	410 + 40	1822 + 180	533 + 42

Eine Verbesserung der Ergebnisse konnte auch durch noch stärkeres Waschen nicht erzielt werden. Dies ist aber für eine Versuchsanordnung mit biologischem Zellmaterial verständlich. K^- Parasiten banden etwas mehr Radioaktivität als nichtinfizierte Erythrozyten. Sie scheinen jedoch nicht an die Melanomazellen gebunden zu sein, sondern saßen vielmehr auf dem Deckgläschen. Wahrscheinlich liegt die Ursache dafür in den unterschiedlichen Dichten der infizierten und nichtinfizierten Zellen. Jedoch wurden nicht von allen Melanomazellen Malaria-Infizierte Erythrozyten (MIE) gebunden. Lichtmikroskopische Untersuchungen zeigten, daß die Zahl der an Melanomazellen gebundenen MIE zwischen 0 und 50 schwankte (Abb. 17). Das Verhältnis Melanomazellen zu MIE variierte von 1:1 bis 1:3.

Die Durchführung des Zytoadhäsionstestes erfolgte auch zu verschiedenen Zeiten nach Merozoiteninvasion. Um die Morphologie der gebundenen Zellen zu untersuchen, wurden einzelne Kulturen nicht markiert. Die Parasitämie nach der Bindung wurde im Lichtmikroskop durch Auszählung von mehr als 500 Feldern bestimmt. Der Invasionsbeginn wurde als Zeitpunkt Null ($t=0$) festgelegt. In Tabelle III sind die Ergebnisse dieser Untersuchung zusammengefaßt.

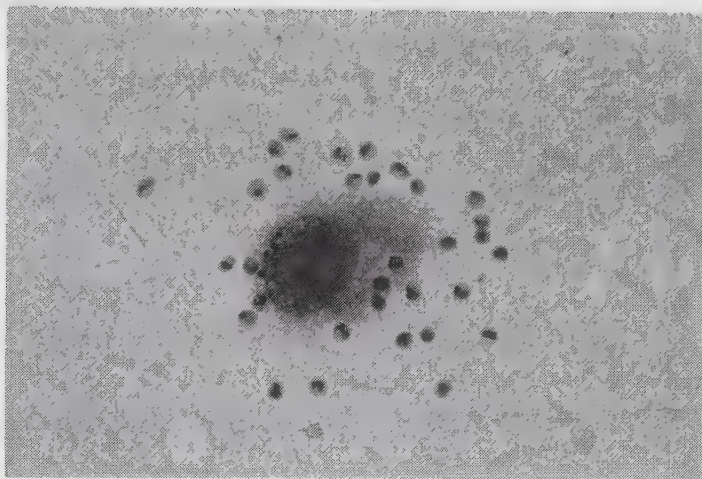


Abb. 17 Lichtmikroskopische Aufnahme infizierter Erythrozyten (*Plasmodium falciparum* K⁺ Stamm) die an Melanomazellen gebunden sind. Die parasitierten Erythrozyten wurden auf Zytoadhäsion 28 h nach Merozoiteninvasion getestet. Vergrößerung: 450 fach.

Tabelle III

Parasitämie nach Synchronisation (Po)		Maximalzeit im Zyklus nach Merozoiteninvasion	Parasitämie nach Bindung (Pb) %		Anreicherung (A)=Pb/Po	
K ⁻	K ⁺		K ⁻	K ⁺	K ⁻	K ⁺
3%	4%	16	8	50	X3	X13
		20	8	64	X3	X16
		24	5	94	X2	X24
		32	ND	88	ND	X22
		40	ND	90	ND	X23

ND = nicht durchgeführt

Nach 16 h ist die Zunahme der Parasitämie in K⁺ Klon etwa 13-fach. Dies läßt die Vermutung zu, daß das/die Molekül/e, das/die für die Zytoadhäsion und vermutlich für die

Sequestration, verantwortlich ist/sind schon nach dieser Zeit in der Membran infizierte Erythrozyten vorhanden ist/sind. Diese Parasitämie nimmt mit der Zeit zu, eine Stabilisierung konnte aber nach 24 h beobachtet werden.

Um festzustellen, ob eine Minimalanforderung an die Zahl des/der Zytoadhäsionsmoleküls/e für die Bindung notwendig ist/sind, wurde eine differenzierte Zählung von gebundenen Zellen durchgeführt. Dadurch sollte auch gezeigt werden, ob diese Anforderung schneller erfüllt wird, wenn zwei oder mehrere Parasiten diese/s Protein/e synthetisieren. Daher wurde zu verschiedenen Zeiten nach der Merozoiteninvasion die Einfach- bzw. Doppelt- oder Dreifach-Invasionen gezählt. Die Ergebnisse sind in Tabelle IV zusammengefaßt.

Tabell IV

		Maximalzeit im Zyklus nach Merozoiteninvasion					
		16		20		24	
	Po	Pb(%)	A	Pb(%)	A	Pb(%)	A
R	3,4	7	X2	8	X2,3	49	X14
RR	0,6	43	X72	60	X100	50	X83
Summe		50	X13	68	X17	99	X25

R = Einfachinvasion
 RR = Doppel- oder Dreifachinvasion
 Abkürzungen wie in Tab. III

Die Zunahme der Parasitämie ist nach 20 h 100 mal so hoch wie in der Gruppe der Doppelinvasion und nur 2fach bei einem Einfachbefall (Abb. 18). 24 h nach Merozoiteninvasion war die Parasitämie in beiden Gruppen ähnlich (49% und 50%).

Wurden infizierte Erythrozyten vor dem Zytoadhäsionstest mit Trypsin behandelt, konnte keinerlei Zytoadhäsion an die Melanomazellen festgestellt werden.

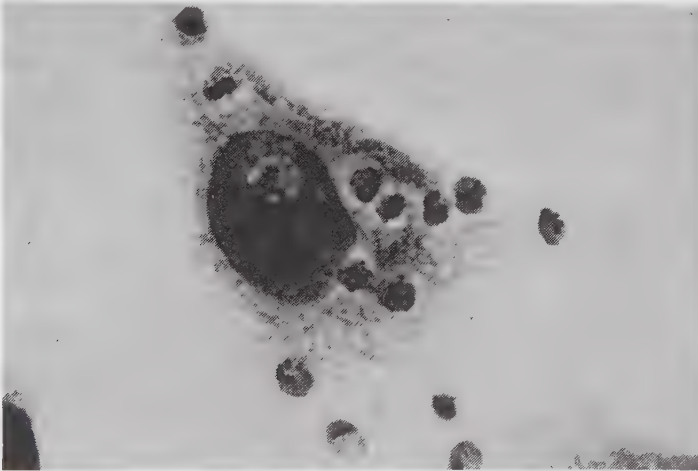


Abb. 18 Lichtmikroskopische Aufnahme infizierter Erythrozyten (*Plasmodium falciparum* K^+ Stamm) gebunden an Melanomazellen. Die Parasiten wurden auf Zytoadhäsion 24 h nach Merozoiteninvasion getestet. Einzel-, Doppel- und Dreifachinvasionen binden im selben Verhältnis an die Melanomazellen. Vergrößerung: 1000-fach.

C. 11 Oberflächenmarkierung

MIE beider FCR3 Klone (K^+ , K^-), sowie nichtinfizierte Erythrozyten wurden oberflächenjodiert, um herauszufinden, ob das 92 000 Da Protein oder andere Proteine, die an der Zytoadhäsion beteiligt sein können, auf der Membran lokalisiert sind. Die Markierung erfolgte zu unterschied-

lichen Zeiten nach Merozoiteninvasion (16, 20 und 24 h). Zur Anwendung kamen 4 Gruppen von Zellen mit unterschiedlicher Parasitämie a) K^- mit mehr als 70%, b) K^+ mit 15%, c) K^- mit 10-15%, und d) unbefallene Erythrozyten zur Kontrolle (Abb. 19). In den K^+ -Proben wurde das Protein vom Molekulargewicht 92 000 Da nicht jodiert, auch bei anderen Proteinen zeigten sich keine Unterschiede zwischen K^+ , K^- und Kontrollerythrozyten. Nur mengenmäßige Veränderungen einzelner Komponenten konnten gesehen werden. Spektrin wurde, wenn auch in geringen Maße, markiert, was möglicherweise auf die Lyse einzelner Zellen während der Behandlung mit Jod zurückzuführen ist (Abb. 19).

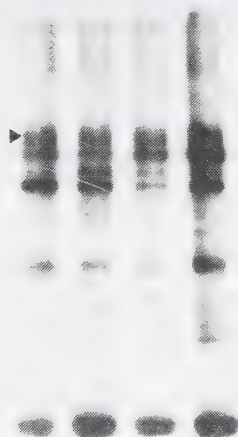


Abb. 19 Autoradiographie nach SDS-PAGE oberflächenjodierter (^{125}J) Erythrozyten 24 h nach Merozoiteninvasion. Von links nach rechts; 1) K^+ (80% Parasitämie) 2) K^+ (15% Parasitämie) 3) K^- (15% Parasitämie) und 4) nichtinfizierte Kontrollerythrozyten. Die Pfeilspitze markiert die Bande 3. Es sind keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Proben zu erkennen.

D. DISKUSSION

Isolierung von homogenen Membranen aus infizierten Erythrozyten und von freien Parasiten

Die Präparation von mit Plasmodien infizierten Erythrozytenmembranen, frei von Parasitenbestandteilen, stellt eine große Schwierigkeit in der Malariaforschung dar. Die bis jetzt angewandten Methoden zur Freisetzung der Parasiten (z.B. hypotonische Lyse, (Christophers S.R., 1939) oder "Nitrogen Cavitation", (Wallach D.F.H., 1977) führen immer zu Membranpräparationen, die mit Parasitenbestandteilen verunreinigt sind. Darüber hinaus gibt es auch keine zufriedenstellende Publikationen über die Reinheit der angereicherten Membranfraktionen. Die Isolierung homogener Wirtszellmembranen und homogener freier Parasiten stellt aber eine Voraussetzung für biochemische Arbeiten, für Arbeiten zur Lokalisierung von Molekülen in verschiedenen Kompartimenten, wie z.B. der des 92 000 Da Proteins, etc. dar. Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Kombination der Freisetzung der Parasiten aus den Wirtserythrozyten mit Lektin und anschließender Percollgradientenzentrifugation, erfolgreich angewendet bei Zelltrennungen, führte zur Isolierung homogener, von Parasitenbestandteilen freier Erythrozytenmembranen und zu freien homogenen Parasiten. Zwei distinkte und charakteristische Proteinmuster konnten für Plasmodium falciparum gefunden werden. Eines für infizierte Erythrozytenmembranen, und ein anderes für freigesetzte Parasiten. Die gegenseitige Kontamination einer

Präparation mit der anderen war vernachlässigbar.

Parallel konnten mit Hilfe der trägerfreien Elektrophorese (FFE) hochangereicherte Membranen aus Wirtserythrozyten isoliert werden, die aber noch geringe Kontaminationen mit freien Parasiten enthielten, deren Reinheit aber für gewisse Versuche für diese Arbeit voll genügte. Der Vorteil dieser Trennmethode ist, daß aufgrund der unterschiedlichen Ladungen die infizierten von den nichtinfizierten Erythrozytenmembranen getrennt und isoliert werden können.

Identifizierung und Charakterisierung des 92 000 Da Proteins in Membranen von Wirtserythrozyten, infiziert mit K^+ -Stämmen von P. falciparum

In einer reinen Membranpräparation aus Erythrozyten, infiziert mit einem Knob-bildenden Klon (K^+) des FCR3 Gambia Stammes, wurde ein Protein mit ca. 92 000 Da als das am stärksten mit ^{14}C -Prolin radioaktiv markierte Molekül identifiziert. Erythrozyten, infiziert mit dem entsprechenden Knob-negativ Klon (K^-) enthalten dieses Protein nicht. Nach Trennung der angereicherten Membranfraktionen des FCR3-Stammes (K^+) durch trägerfreie Elektrophorese findet man eine Anreicherung der Knobs in den anionischen Fraktionen der Elektrophorese (28-32), die also Membranen von infizierten Erythrozyten enthalten. Die Analyse derselben Präparationen in der PAGE zeigt einen sehr großen Gehalt des 92 000 Da Proteins im Vergleich mit den kationischen Fraktionen (33-39), die Membranen aus nicht-

infizierten Erythrozyten enthalten und keine Knobs besitzen. Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, daß sich das Protein in der Membran der infizierten Wirtserythrozyten befindet.

Das 92 000 Da Protein wird ausschließlich während des Ringstadiums (zwischen 9-21 h nach Merozoiteninvasion) und nicht von Trophozoiten oder reiferen Formen gebildet. Dies erklärt die Tatsache, warum andere Autoren (Gruenberg, 1983, Allred, 1983) in ihren Untersuchungen dieses Protein nicht identifizieren konnten, da sie die Parasiten erst im Trophozoitenstadium, d.h., nach der Synthese des 92 000 Da Proteins, metabolisch markiert haben. Die Synthese des Knob-assoziierten Proteins scheint ein komplexer Prozess zu sein. Ein Einbau von radioaktivem Prolin in das 92 000 Da Protein - andere Aminosäuren wie Methionin oder Isoleucin markieren das Protein nicht gut - findet erst 8 h nach Markierungsbeginn statt. Dies mag auch der Grund für das Vorkommen oder das Fehlen des 92 000 Da Proteins in verschiedenen Präparationen sein, wie sie von Hadley (1983) beschrieben wurde. Ein Precursormolekül mit hohem Molekulargewicht konnte in "pulse-chase" Versuchen nicht nachgewiesen werden. Nichtdestoweniger ist die Möglichkeit nicht auszuschließen, daß ein kleines Precursormolekül an der Proteinsynthese beteiligt ist und daß dieses vor Einbau in das endgültige Protein modifiziert werden muß.

In isolierten freien Parasiten, die keine Erythrozytenmembranen enthielten, konnte das 92 000 Da Protein niemals nachgewiesen werden, obwohl das Protein unbedingt vom

Parasiten synthetisiert wird. Dies konnte durch metabolische Radiomarkierung bewiesen werden, da Erythrozyten in Kultur keine Proteinsynthese durchführen. Das Nichtfinden des 92 000 Da Proteins in freien Parasiten deutet möglicherweise auf einen sehr schnellen Transport des Moleküls nach seiner Synthese vom Parasiten in die Erythrozytenmembran hin. Eine andere Möglichkeit für das Fehlen des Proteins in den Parasiten könnte enzymatischer Abbau des Proteins während des Isolierungsprozesses durch parasiteneigene Enzymsysteme sein. Dies scheint jedoch unwahrscheinlich, da nach Zugabe von Proteaseblockern während der Isolierung keine Änderung des Proteinmusters zu finden war. Überdies konnte in Membranpräparationen, die mit vielen Parasiten und Debris verunreinigt waren, immer das Protein nachgewiesen werden.

Das 92 000 Da Proteinmolekül muß vom Parasiten durch die Erythrozytenmatrix transportiert und dann in die Membran und/oder das Zytoskeleton eingebaut werden. Diese Annahme und dieser Weg des Moleküls, obwohl schwer erklärbar - eine Durchwanderung des Proteins durch die Parasitenmembran und dann auch noch durch die parasitophore Membran - wird durch das Auftreten von Silberkörnern in der Erythrozytenmatrix nach Inkorporation von ^3H -Prolin und elektronenmikroskopischer Analyse verstärkt. Etwa 14% dieser Signale findet man zwischen den Parasiten und der Erythrozytenmembran. Ob diese Ergebnisse ausschließlich auf den Transport des 92 000 Da Proteins oder den Transport auch anderer Proteine zurückzuführen sind, ist aus der Versuchsanordnung nicht eindeutig zu beweisen, weist aber darauf hin, daß dieser

Mechanismus des Proteineinbaus bei P. falciparum existiert. Keine Anzeichen sprechen dafür, daß der Proteineinbau auf direktem Kontakt des Parasiten mit der Erythrozytenmembran zurückzuführen ist. Die Möglichkeit des Transportes des Proteins in "Maurer clefts" (Aikawa M., 1982) muß in Erwägung gezogen werden, die nur bei P. falciparum infizierte Erythrozyten zum Zeitpunkt des Ring- und Trophozoitenstadiums sichtbar sind.

Das 92 000 Da Protein scheint aus folgenden Gründen mit den Knobs in irgendeiner Form assoziiert zu sein: Das 92 000 Da Molekül läßt sich nur in Knob-bildenden (K^+), aber nicht in Knob-negativ (K^-) P. falciparum Stämmen und isolierten Membranen von Wirtserythrozyten nachweisen. Darüber hinaus läßt sich die große Menge des 92 000 Da Proteins und die hohe Anreicherung von Knobs in isolierten Membranen aus infizierten Erythrozyten in ein Verhältniss bringen. Das Auftreten des 92 000 Da Proteins in den Erythrozytenmembranproteinen fällt mit dem Zeitpunkt zusammen, zu dem die ersten Knobs elektronenmikroskopisch identifiziert werden können (16-18 h nach Merozoiteninvasion).

Für die Assoziation mit den Knobs bieten sich zwei Möglichkeiten an. Zum Ersten, daß das Protein selbst die Knobs bildet, mit anderen Worten, das 92 000 Da Protein ist das elektronendichte Material, welches im Elektronenmikroskop zu sehen ist. Zum Zweiten, daß das 92 000 Da Protein ein Bestandteil der Knobs ist. Nach enzymatischer Behandlung der Trophozoitenstadien konnte das 92 000 Da

Protein in den anschließend isolierten Erythrozytenmembranen nicht mehr nachgewiesen werden. Trotzdem konnte man nach Analyse von Dünnschnitten im Elektronenmikroskop Knobs in diesen mit Enzymen behandelten Erythrozyten erkennen. Weiterhin zeigten sich weder Änderung in der morphologischen Form noch veränderte Bildungszeiten der Knobs, wenn man Ringformen noch vor der Synthese des 92 000 Da Proteins mit Trypsin inkubierte. Trotzdem konnte offensichtlich das Protein nicht in die Membran eingebaut werden, denn es war nicht nachweisbar. Diese Experimente lassen den Schluß zu, daß Knobs gebildet werden, auch wenn sich das 92 000 Da Protein nicht in der Membran befindet.

Obwohl das 92 000 Da Protein irgendwie mit den Knobs zusammenhängen muß, ist es nicht eine Anhäufung (evtl. Aggregatbildung) dieses Proteins, welche die Knobs bildete. Dies läßt sich auch mit der Tatsache in Übereinstimmung bringen, daß das 92 000 Da Protein im Ringstadium zwar das am stärksten radioaktiv markierte Protein ist, aber in mit Coomassie Blau gefärbten Gelen nur ein mengenmäßig schwache Proteinbande darstellt. Eine solch geringe Proteinmenge kann nicht die Ursache der starken morphologischen Verdickungen unter der Erythrozytenmembran sein. Alle diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zur Hypothese von Leech et al. (1984), daß es sich bei dem 92 000 Da Protein (dort "histidin rich protein" genannt, da es in dieser Arbeit bevorzugt mit ^{14}C -Histidin markiert wurde) um das Protein handelt, welches das elektronendichte Material der Knobs bildet.

Auch die Tatsache, daß das 92 000 Da Protein durch Enzyme von der Zellaußenseite her gespalten werden kann, bedeutet nicht notwendigerweise, daß es an der Oberfläche exponiert ist. So werden einige Bestandteile der Erythrozytenmembran wie z.B. Bande 3, und der Erythrozytenmembraninnenseite, wie z.B. Spektrin, durch die gleiche Behandlung angegriffen. Es ist möglich, daß dieses Protein nur enzymatisch abgebaut wird, wenn auch andere Komponenten der Erythrozytenmembran in Mitleidenschaft gezogen werden. Nichtsdestoweniger lassen diese Experimente den Schluß zu, daß sich das Protein nicht auf der dem Zellinneren zugekehrten Seite des Zytoskeletons befindet - wenn das 92 000 Da Protein vollkommen durch Trypsin gespalten wurde, findet sich noch eine große Menge Spektrins und einige Proteine wie Bande 4.2 die überhaupt nicht abgebaut wird, in der Membran - sondern irgendwo zwischen dem Zytoskeletton und der Zellmembran.

Für eine starke Assoziation des 92 000 Da Proteins mit dem Zytoskeletton sprechen Extraktionen mit verschiedenen Detergentien. Obwohl Natriumdeoxycholat, Triton X-100 und Zwittergent B12 die Erythrozytenmembran vollkommen und das Zytoskeletton des Erythrozyten teilweise extrahieren, wird das 92 000 Da Protein nicht extrahiert. Im nichtextrahierten Material konnten auch noch Reste von Spektrin nachgewiesen werden. Dies läßt den Schluß zu, daß das Protein mehr mit dem Zytoskeletton als mit der Membran assoziiert ist. Eine Extraktion mit Lubrol, CHAPS und Tween 20 war ungeeignet zur Extraktion des Zytoskeletons. Auch geringe Zusätze von SDS (0,2%-0,5% w/v) zu diesen Detergentien konnten die

Ergebnisse nicht viel verbessern. Das Protein wurde nur von Detergentien extrahiert, welche das Zytoskeletton total auflöst (Natriumdeoxycholat oder Triton X-100 in 5M Harnstoff; SDS 2% mit β -Mercaptoäthanol). In dem dabei nicht extrahierten Material konnte kein Spektrin und nur wenig der anderen Zytoskelettonproteine nachgewiesen werden, auf keinen Fall wurde das 92 000 Da Protein mehr gefunden.

Mögliche Funktionen des 92 000 Da Proteins

Das Auftreten des 92 000 Da Proteins und der Knobs korreliert mit dem Zeitpunkt, zu dem junge Trophozoiten in vivo sequestrieren. Von den Knobs konnte auf ultrastruktureller Ebene gezeigt werden, daß sie die Adhäsionsstellen parasitierter Erythrozyten an das Endothelium darzustellen scheinen. Knob-bildende Erythrozyten können jedoch ihre Fähigkeit an das Endothelium oder an Melanomezellen zu binden, als Ergebnis langzeitiger in vitro Kultivierung (Udeinya et al., 1983) enzymatischer Behandlung (David et al., 1983) oder durch Veränderungen in der Milz (David et al., 1983) verlieren. Daraus kann der Schluß gezogen werden, daß mit Knobs in Beziehung stehende Bestandteile, aber nicht die Knobs selbst, am Sequestriationsprozeß beteiligt sind. Da das 92 000 Da Protein das einzige von Parasiten stammende Protein ist, welches mit Knobs assoziiert ist und es in ausreichenden Mengen 17-20 h nach Merozoiteninvasion auftritt, scheint es wahrscheinlich, daß es das bindende Molekül ist und daher auch auf der Oberfläche des Erythrozyten sitzt. Trotzdem kann das

92 000 Da Protein durch Oberflächenjodierung nicht markiert werden. Die Gründe dafür könnten sein, daß das Protein nicht an der Oberfläche von Malaria-infizierten Erythrozyten exponiert ist, oder daß das exponierte Polypeptid keine oder sehr wenige erreichbare Tyrosinreste enthält. Auf der anderen Seite konnte kein anderes Protein, welches nur im K^+ Klon auftrat, identifiziert werden.

Vor Kurzem fanden Aley et al. (1984) und Leech et al. (1984 a und b) ein stammspezifisches P. falciparum Antigen auf der Oberfläche infizierter Erythrozyten, das in K^- Stämmen nicht auftritt. Dieses Antigen kann oberflächenjodiert und metabolisch markiert werden und es besitzt ein Molekulargewicht von 250 000-290 000 Da. Überdies läßt es sich mit Immunserum, die ganz allgemein auch die Zytoadhäsion blockieren, immunpräzipitieren. Die Autoren schlossen daraus, daß es sich hierbei um das Bindungsmolekül handelt. Sie analysierten jedoch nur Trophozoiten oder junge Schizontenstadien, nicht aber Ringstadien. Auch beim K^+ Klon des FCR3 Stammes konnte in eigenen Versuchen ein Antigen mit ähnlichem Molekulargewicht durch metabolische Markierung, nicht aber durch Oberflächenjodierung, und jedoch nur im Trophozoitenstadium (mehr als 26 h nach Merozoiteninvasion) gefunden werden. Aufgrund dieser widersprüchlichen Tatsachen sind zusätzliche Informationen notwendig, die die Zytoadhäsion an die Melanomazellen im Zeitbereich zwischen 16-24 h des erythrozytären Zyklus, d.h. im Ringstadium erklären.

Bis jetzt gibt es keinen Hinweis oder Beweis dafür, daß das 92 000 Da Protein, welches schon 16 h nach der Merozoiteninvasion in der Erythrozytenmembran auftritt, an der Oberfläche infizierter Erythrozyten exponiert ist. Man könnte sich vorstellen, daß das Protein nur dann exponiert wird, wenn der Parasit im Kontakt mit den Endothelzellen kommt. Die Exponierung eines für das Überleben des Parasiten entscheidenden Bindungsmoleküls an der Oberfläche, lange vor dem Anheftungsprozeß könnte für den Parasiten gefährlich werden, zumal wenn dieses Molekül gegen tryptische Aktivitäten empfindlich ist, insbesondere aber, wenn sich gegen dieses zugängliche Molekül Antikörper bilden. Auf jeden Fall muß das Bindungsmolekül (das 92 000 Da Protein und/oder das 250 000-290 000 Da Protein oder andere Proteine) vom Parasiten stammen. Dies wird durch die Tatsache gestützt, daß Erythrozyten, die von zwei oder drei Merozoiten befallen wurden, leichter an Melanomazellen binden, als einfach befallenen Erythrozyten. Daraus kann man folgern, daß zwei oder drei oder mehrere Parasiten in einen Erythrozyten zwei bis drei oder vielfach sovielen Moleküle beisteuern, die für die Adhäsion notwendig sind.

Da es nicht möglich war, das 92 000 Da Protein mit Immunsérum zu präzipitieren - was z.T. auf technischen Schwierigkeiten beruht, denn das Protein ist nur extrahierbar und löslich in 5M Harnstoff, Bedingungen also, unter denen Immunpräzipitationen nicht möglich sind - ist seine Antigenität unbewiesen. Das Protein wäre jedoch, wenn sich seine Beteiligung an Zytoadhäsionsprozeß d.h., an der

Umgehung des menschlichen Immunsystems bewahrheitet, ein ideales Zielmolekül für eine aktive Immunisierung beim Menschen. Die Tatsache, daß das Molekül in zwei K⁺ Stämmen aus zwei verschiedenen endemischen Gebieten gefunden wurde und daß beide Moleküle aufgrund des limitierten Proteaseabbaus sehr ähnlich gebaut sind läßt hoffen, daß dies ein parasiteneigenes Molekül ist, das auch in anderen P. falciparum Stämmen identifiziert werden kann und dort identisch ist. Nach den neuesten Berichten über die Verschiedenheit und die Variabilität der Antigene bei Plasmodium falciparum (McBride, 1982, 1985; Thaitong, 1984; Hommel, 1983; Knowles, 1984) ist das Auffinden und Charakterisieren von solchen Antigenen, von denen man annehmen kann, daß sie sich nicht verändern, oder daß sie wenigstens konstante Epitope im Molekül tragen, von größter Bedeutung für die Malariaforschung.

E. ZUSAMMENFASSUNG

- (1) Es wurde eine Methode zur Isolierung von einheitlichen Membranen von mit Plasmodium falciparum infizierten Erythrozyten (IE) aus synchronen Kulturen entwickelt. Freie Parasiten und IE Membranen konnten durch iso-osmotische Gradienten-Zentrifugation mit Percoll getrennt werden. Die Analysen dieser Fraktionen durch Elektronenmikroskopie und SDS-PAGE zeigten ein charakteristisches Proteilmuster für beide Kompartimente und vernachlässigbare Kontaminationen.
- (2) Nach Infektion der Erythrozyten mit einem Knob-bildenden (K^+) Klon von Plasmodium falciparum (FCR3-Stamm) enthielten die isolierten Erythrozytenmembranen ein 92 000 Da Protein, welches nicht vorhanden war, wenn Erythrozyten mit einem Knob-negativen (K^-) Klon infiziert wurden. Das Protein konnte metabolisch mit radioaktivem ^{14}C -Prolin in Kultur markiert werden, und wurde als das Hauptprotein identifiziert, das von Parasiten während des Ringstadiums gebildet wurde. Das Protein wird dann in die Wirtserythrozytenmembran eingebaut.
- (3) Die Anwesenheit von Proteinen, die vom Parasiten gebildet und dann in die Erythrozytenmembran eingebaut werden, wurde auch durch Autoradiographieexperimente im Elektronenmikroskop bestätigt. Diese Experimente legen nahe, daß ein Transport von Proteinen durch die

Erythrozytenmatrix abläuft und daß es nicht ein direkter Kontakt zwischen dem Parasiten und der Erythrozytenmembran ist, der zu dem Proteineinbau in die Erythrozytenmembran führt.

- (4) Trennungen mit Hilfe der trägerfreie Elektrophorese von Membranen aus infizierten (K^+) und nichtinfizierten Erythrozyten ließen den Schluß zu, daß das 92 000 Da Protein mit den Ausstülpungen in der Erythrozytenmembran, den Knobs, in Zusammenhang steht.
- (5) Das 92 000 Da Protein wird nur im Zeitraum von 9-21 h nach Merozoiteninvasion gebildet, dann stoppt die Synthese völlig. Die Synthese des 92 000 Da Proteins scheint ein komplexer Prozess zu sein: der Parasit benötigt ca. 8 h für die Synthese des Proteins. "Pulse-chase" Experimente zeigten, daß das Protein dann sehr schnell vom Parasiten in die Erythrozytenmembran transportiert wird, und daß die Hauptmenge des 92 000 Da Proteins in der Erythrozytenmembran ungefähr 16-18 h nach Merozoiteninvasion vorhanden ist.
- (6) Obwohl das 92 000 Da Protein in irgendeiner Form mit den Knobs zusammenhängt, ist es nicht eine Anhäufung des Proteins (z.B. eine Aggregation des Proteins), welche die Knobs bildet: Nach Spaltung des Proteins mit Enzymen (Trypsin, Chymotrypsin) behielten die Zellen ihre Knobs, welche dann auch morphologisch nicht von den Knobs der Kontrollzellen unterscheidbar waren. Die Behandlung des Wirtserythrozyten mit diesen Enzymen vor

der Bildung des 92 000 Da Proteins, d.h. eine enzymatische Veränderung der Wirtszellmembran vor Einbau des Proteins, läßt zwar die Bildung von Knobs zu, läßt aber das Protein nicht im Membran-Zytoskeleton Kompartiment erscheinen.

- (7) Extraktionsversuche mit verschiedenen Detergentien zeigen, daß das 92 000 Da Protein sehr stark mit dem Erythrozytenskeleton zusammenhängt. Detergentien, welche Membrankomponenten (z.B. Bande 3) extrahieren, extrahieren das Protein nicht. Eine Extraktion des Proteins ist nur möglich mit Systemen, welche das Zytoskeleton völlig auflösen.
- (8) Es war nicht möglich zu zeigen, daß das 92 000 Da Protein auf der Oberfläche des infizierten Erythrozyten frei exponiert ist. Experimente zur Oberflächenjodierung konnten das Protein nicht markieren. Es zeigten sich keine Unterschiede zwischen der jodierten Zelloberfläche von mit K^+ oder K^- Parasiten infizierten Erythrozyten.
- (9) Die Zeit, in der die Hauptmenge des 92 000 Da Proteins in der Erythrozytenmembran auftritt, fällt genau mit der Zeit zusammen, in der die infizierten Zellen in einem in vitro Test an Melanomazellen binden (und auch mit der Zeit, in der in vivo die infizierten Erythrozyten an die Endothelzellen der zentralen Kapillaren binden). Die Moleküle, die für diese Zytoadhäsion verantwortlich sind, stammen vom

Parasiten. Erythrozyten, die doppelt oder dreifach befallen sind, binden stärker an die Melanomazellen als Erythrozyten, die mit einem einzigen Parasiten befallen sind. Dies legt nahe, daß mehr Parasiten in einem Erythrozyten auch mehr Zytoadhäsionsmoleküle bilden und in die Erythrozytenmembran einbauen.

- (10) Aufgrund all dieser Daten wird die Funktion des 92 000 Da Proteins als das Molekül, das für die Zytoadhäsion verantwortlich ist, diskutiert. Die Sequestration und Zytoadhäsion von mit Malariaparasiten infizierten Erythrozyten im Ring-Trophozoitenstadium ist ein Prozeß, der für das Krankheitsbild der Malaria beim Menschen verantwortlich ist.

F. LITERATURVERZEICHNIS

- Aikawa M. and Miller L. 1983. Structural alternations of the erythrocyte membrane during malarial parasite invasion and intraerythrocytic development. In Ciba Foundation Symposium pp. 57. Ed. by Pitman Books Ltd. London.
- Aikawa M., Rabbege J.R. and Wellde B.T. 1972. Junctional apparatus in erythrocytes infected with malarial parasites. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie* 124:72-75.
- Aikawa M. 1977. Variations in structure and function during the life cycle of the malarial parasite. *Bulletin of the World Health Organization* 55:139-156.
- Aley S.B., Sherwood J.A. and Howard R.J. 1984. Knob-positive and knob-negative Plasmodium falciparum differ in expression of a strain-specific malarial antigen on the surface of infected erythrocytes. *J. Exp. Med.* 160:1585-1590.
- Allison A.C. and Eugui E.M. 1983. The role of cell-mediated immune responses in resistance to malaria, with special reference to oxidant stress. *Ann. Rev. Immunol.* 1:361-392.
- Allred D.R., Sherman I.W. 1983. Developmental modulation of protein synthetic patterns by the human malarial parasite Plasmodium falciparum. *Can. J. Biochem. Cell Biol.* 61:1304-1314.
- Areekul S., Chantachum T., Cheeramakara C., Churdchu K. and Attanath P. 1982. Red cell acetylcholinesterase activity in Plasmodium falciparum malaria. *Southeast Asian J. Trop. Med. Hith.* 13:196.
- Christophers S.R. and Fulton J.D. 1979. Experiments with isolated malaria parasites (Plasmodium knowlesi) free from red cells. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 33: 161-170.
- Cleveland D.W., Fischer S.C., Kirschner M.W., Lämml U.K. 1977. Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and by gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 252:1101-1106.
- Cohen S., Butcher G.A., Crandall R.B. 1969. Action of malaria antibody in vitro. *Nature* 223: 368-371.
- Cohen S. 1979. Immunity to malaria. *Proc. R. Soc. Lond B* 203:323-345.
- Cranston H.A., Boylan C.W., Carroll G.L., Sutern S.P., Williamson J.R., Gluzman I.Y. and Krogstad D.J. 1984. Plasmodium falciparum maturation abolishes-Physiologic red cell deformability. *Science* 223:400-402.

David P.H., Hommel M., Miller L.H., Udeinya, I.J. and Oligino L.D. 1983. Parasite sequestration in Plasmodium falciparum malaria: Spleen and antibody modulation of cytoadherence of infected erythrocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:5075-5079.

Deans J.A., Cohen S. 1983. Immunology of malaria. Ann. Rev. Microbiol. 37:25-49.

Dunn M.J. 1969. Alternations of red blood cell sodium transport during malarial infection. J. Clin. Invest. 48:674-684.

Dvorak J.A., Miller L.H., Whitehouse W.C. and Shiroishi T. 1975. Invasion of erythrocytes by malaria merozoites. Science 187:748-750.

Fischer H.A. and Wernr G. 1972. Histochemie 29:44-53.

Gershoni J.M., Palade G.E. 1983. Protein blotting: principles and applications. Anal. Biochem. 131: 1-15.

Green T.J., Gadsden G., Seed T., Jacobs R., Morhardt M. and Brackett R. 1985. Cloning and characterization of Plasmodium falciparum. Am. J. Trop. Med. Hyg. 34(1):24-30.

Gruenberg J., Allred D.R. and Sherman I.W. 1983. Scanning electron microscope-analysis of the protrusions (knobs) present on the surface of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. J. Cell. Biol. 97:795-802.

Gruenberg J. and Sherman I.W. 1983. Isolation and characterization of the plasma membrane of human erythrocytes infected with the malarial parasite Plasmodium falciparum. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:1087-1091.

Hadley T.J., Leech J.H., Green T.J., Daniel W.A., Miller L.H. and Howard R.J. 1983. A comparison of Knobby (K+) and Knobless (K-) parasites from two strains of Plasmodium falciparum. Mol. Biochem. Parasitol. 9:271-278.

Hannig K. and Heidrich H.-G. 1974. The use of continuous preparative free-flow electrophoresis for dissociating cell fractions and membraneous components. Meth. Enzymol. 31:746-751.

Heidrich H.-G., Mrema J.E.K., Van der Jagt D.L., Reyes P., Rieckmann K.H. 1982. Isolation of intracellular parasites (Plasmodium falciparum) from culture using free-flow electrophoresis: separation of the free parasites according to stages. J. Parasitol. 68:443-450.

Heil A. and Zillig W. 1970. Reconstitution of bacterial DNA-dependent RNA-polymerase from isolated subunits as a tool for the elucidation of the role of the subunits in transcription. FEBS Letters 11(3):165.

Holz G.G. Jr. 1977. Lipids and the malarial parasite. Bull WHO, 55:237-248.

Hommel M., David P.H. and Oligino L.D. 1983. Surface alterations of erythrocytes in Plasmodium falciparum malaria : Antigenic Variation, antigenic diversity and the role of the spleen. J. Exp. Med. 157:1137-1148.

Howard R.J. 1983. Discussion in Cyba Foundation Symposium. Pitman Books Ltd. London, pp 133. Influence of the spleen on the expression of surface antigens on parasitized erythrocytes, by Barnwell J.W., Howard R.J. and Miller L.H.

Jensen J.B. 1977. Concentration from continuous culture of erythrocytes infected with trophozoites and schizonts of Plasmodium falciparum. Am. J. Trop. Med. Hyg. 27:1274-1276.

Kilejian A., Abati A. and Trager W. 1977. Plasmodium falciparum and Plasmodium coatneyi: Immunogenicity of "knob-like protrusions" on infected erythrocyte membranes. Exp. Parasitol. 42:157-164.

Kilejian A. 1979. Characterization of a protein correlated with the production of knob-like protrusions on membranes of erythrocytes infected with Plasmodium falciparum. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:4650-4653.

Knowles G., Davidson W.L., McBride J.S. and Jolley D. 1984. Antigenic diversity found in isolates of Plasmodium falciparum from Padua New Guinea by using monoclonal antibodies. Am. J. Med. Hyg. 33(2):204-211.

Koenigk E. and Mirtsch S. 1977. Plasmodium chabaudi-infection of mice: specific activities of erythrocyte membrane-associated enzymes and patters of proteins and glycoproteins of erythrocyte membrane preparations. Tropenmed. Parasitol. 28:17-22.

Kreier J.P. and Green T.J. 1980. The vertebrate host's immune response to Plasmodia in malaria. Vol. 3: Immunology and Immunization (J.P. Kreier, ed) pp 137-141. Acad. Press New York.

Kutner S., Ginsburg H. and Gabantchik Z.I. 1983 Permsselectivity changes in malaria (P.falciparum) infected human red blood cell membranes. J. Cell. Physiol. 144:245-251.

Lämmli U.K., Favre M. 1973. Maturation of the head of bacteriophage T4. DNA packaging events. Mol. Biol. 80:575-579.

Lambros C. and Vanderberg J.W. 1979. Synchronization of Plasmodium falciparum erythrocytic stages in culture. J. Parasitol. 65:418-420.

Langreth S.G., Jensen J.B., Reese R.T. and Trager W. 1978.

Fine structure of human malaria in vitro. J. Protozool. 25:443-452.

Langreth S.G. and Reese R.T. 1979. Antigenicity of the infected erythrocyte and merozoite surfaces in P.falciparum malaria. J. Exp. Med. 150:1241-1254.

Langreth S.G., Reese R.T., Motyl M.R. and Trager W. 1979. Plasmodium falciparum: loss of knobs on the infected erythrocyte surface after long-term cultivation. Exp. Parasitol. 48:213-219.

Langreth S.G. and Peterson E. 1985. Pathogenicity stability and immunogenicity of a knobless clone of Plasmodium falciparum in Colombian Owl monkeys. Infection and Immunity 47(3):760-766.

Leech J.H., Barnwell J.W., Miller L.H. and Howard R.J. 1984. Plasmodium falciparum Malaria: association of knobs on the surface of infected erythrocytes with a Histidine-rich protein and the erythrocyte skeleton. J. Cell Biol. 98:1256-1264.

Leech J.H., Barnwell J.W., Miller L.H. and Howard R.J. 1984. Identification of a strain-specific malarial antigen exposed on the surface of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. J. Exp. Med. 159:1567-1575.

Leech J.H., Aley S.B., Miller L.H. and Howard R.J. 1984. Plasmodium falciparum malaria: Cytoadherence of infected erythrocyte membrane. Malaria and red cell, Alan R. Liss, Inc., New York, pp 63-77.

Leida M.N., Mahoney J.R. and Eaton J.W. 1981. Intraerythrocytic plasmodial calcium metabolism. Biochem. Biophys. Res. Comm. 103:402-406.

Luse S.A. and Miller L.H. 1971. Plasmodium falciparum malaria: Ultrastructure of parasitized erythrocytes in cardiac vessels. Am. J. Trop. Med. Hyg. 20:655.

McBride J.S., Walliker D. and Morgan G. 1982. Antigenic diversity in the human malaria parasite Plasmodium falciparum. Science 217:254-257.

McBride J.S., Newbold Ch.I. and Ananod R. 1985. Polymorphism of a high molecular weight schizont antigen of a human malaria parasite Plasmodium falciparum. J. Exp. Med. 161:160-180.

McGregor I.A., Carrington S.P. and Cohen S. 1963. Treatment of East African P.falciparum malaria with West African human -globulin. Trans. R. Soc. Med. Hyg. 57:170.

Parish R.W., Schmidlin S. and Müller U. 1977. The effects of proteases on proteins and glycoproteins of Dictyostelium

discoideum plasma membranes. Exp. Cell. Res. **110**:267-276.

Pasvol G., Wilson R.J., Salley M.E. and Brown J. 1978. Separation of viable schizont-infected red blood cells of Plasmodium falciparum from human blood. Ann. Trop. Med. Parasitol. **72**:87-88.

Reese R.T., Langreth S.G. and Trager W. 1979. Isolation of stages of the human parasite Plasmodium falciparum from culture and from animal blood. Bull WHO **57**:53-61.

Philips D.R. and Morrison M. 1971. Exposed proteins on intact erythrocytes. Biochem. **10**:1766-1771.

Rivadeneira E.M., Wasserman M. and Espinal C. 1983. Separation and concentration of schizonts of Plasmodium falciparum by percoll gradients. J. Protozool. **30**(2):367-370.

Schmidt J.A., Udeinya I.J., Leech J.H., Hay R.J., Aikawa M., Barnwell J., Green I. and Miller L.H. 1982. Plasmodium falciparum malaria: an amelanotic melanoma cell line bears receptors for the knob ligand on infected erythrocytes. J. Clin. Invest. **70**:379-386.

Sherman I.W. 1979. Biochemistry of Plasmodium (Malaria parasites). Microbiol. Rev. **43**(4):453-495.

Stanley H.A., Reese R.J. 1984. In vitro inhibition of intracellular growth of Plasmodium falciparum by immune sera. Am. J. Trop. Med. Hyg. **33**(1):12-16.

Stanley H.A., Mayes J.T., Cooper N.R. and Reese R.T. 1984. Complement activation by the surface of Plasmodium falciparum infected erythrocytes. Molecular Immunology **21**(2):145-150.

Thaitong S., Beale G.H., Fenton B., McBride J., Rosario W., Walker A. and Walliker D. Clonal diversity in a single isolation of the malaria parasite Plasmodium falciparum. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. **78**:242-245.

Trager W., Rudzinska M.A. and Bradbury P.C. 1966. The fine structure of Plasmodium falciparum and its host erythrocytes in natural malarial infection in man. Bulletin WHO **35**:833-885.

Trager W. and Jensen J.D. 1976. Human malaria parasites in continuous culture. Science **193**:673-675.

Trager W. and Lanners H.N. 1984. Initial extracellular development in vitro of merozoites of Plasmodium falciparum. J. Protozool. **31**(4):562-567.

Udeinya I.J., Schmidt J.A., Aikawa M., Miller L.H. and Green I. 1981. Falciparum malaria-infected erythrocytes: specifically bind to cultured human endothelial cells. Science

213:555-557.

Udeinya I.J., Graves P.M., Carter R., Aikawa M. and Miller L.H. 1983. Plasmodium falciparum: Effect of time in continuous culture on binding to human endothelial cells and amelanotic melanoma cells. Exp. Parasitol. 56:207-214.

Wallach D.F.H. and Conley M. 1977. Altered membrane proteins of monkey erythrocytes infected with simian malaria. J. Mol. Med. 2:119-136.

Wray W., Boulikas T., Wray V.P. and Hancock R. 1981. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. Anal. Biochem. 118:197-203.

Wyler D.J. 1979. Cellular aspects on immunoregulation in malaria. Bull. WHO 57(Suppl. 1):239.

LEBENS LAUF

Name	Jean Paul Vernot Hernandez
Geburtstag	20. April 1959
Geburtsort	Bogota, Kolumbien
Staatsangehörigkeit	Kolumbianer
Eltern	Antoine Vernot, Blanca de Vernot
Schulbildung	1965-1976 5 Jahre "Elemental" und 6 Jahre "Bachillerato" am Lycee Francais Louis Pasteur, Bogota, Kolumbien.
Hochschulbildung	1976-1981 Studium der Fächer Biologie an der Universidad Javeriana, Bogota, Kolumbien.
Berufstätigkeit	Ab 1981 Wissenschaftlicher Assistent an der Biochemie Gruppe im Instituto Nacional de Salud, Bogota. Seit Oktober 1982 Doktorand am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried, mit einem Auslandsstipendium der Max-Planck-Gesellschaft.

